دومین کنفرانس بین المللی ۲۴ اسفند ۱۳۹۴
پژوهشهای نوین در
علوم کشاورزی و محیط زیست
14 March 2016
2nd.International Conference On Modern Research In
Agricultural Science And Environment

اثرات افزودن مقادیر متفاوت پودر سیر و اکالیپتوس بر فراسنجه های تخمیری شکمبه در شرایط برون تنی

مهدی مهرابادی

دانشجوی دکتری تغذیه دام دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد mehrabadimehdi@yahoo.com

سید علیرضا وکیلی

دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد savakili@ferdowsi.um.ac.ir

محسن دانش مسگران

استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد danesh@um.ac.ir

رضا ولی زاده

استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد rvalizadeh@yahoo.com

چکیده:

در این مطالعه ی برون تنی، اثر سه مقدار(۵، ۱۰ و ۱۵درصد ماده خشک کنسانتره) از هر کدام از دو گیاه دارویی شامل سیر($G_{۵}$،$G_{۱۰}$،$G_{۱۵}$) و اکالیپتوس($E_{۵}$،$E_{۱۰}$،$E_{۱۵}$) بر فراسنجه های تخمیر شکمبه مورد بررسی قرار گرفت. جیره ای مخلوط از ۴۰٪ علوفه و ۶۰٪ کنسانتره به عنوان خوراک پایه مورد استفاده قرار گرفت. گاز تولیدی در ساعت های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد گیاهان سیر و اکالیپتوس بر میزان تولید گاز در شرایط برون تنی تاثیر گذار است. افزودن تک تک سطوح مختلف گیاهان دارویی باعث افزایش معنی دار میزان گاز تولید در ۲۴ ساعت نسبت به تیمار شاهد گردیده است. ($p<۰/۰۱$). درصد گاز متان نسبت به کل گاز تولیدی در تیمارهای حاوی سطوح مختلف گیاهان دارویی کاهش یافته است. به طوری که درصد این کاهش نسبت به خوراک پایه در برخی از تیمارها به بیش از ۴۰درصد رسیده است(E_{10} و E_{15}). میزان pH شکمبه در ساعت ۹۶ نیز در تیمارهای گیاه دارویی در مقایسه با تیمار شاهد مقداری کاهش نشان داد هر چند این تفاوت به لحاظ آماری معنی دار نبود. از انجایی که میزان گاز تولید شده با تخمیر پذیری مواد خوراکی رابطه مستقیم دارد و هرچقدر میزان تخمیر پذیری بیشتر باشد میزان گاز تولید شده نیز بیشتر است. بنابراین افزایش میزان گاز تولید شده در تیمارها با افزودن مقادیر مختلف گیاهان دارویی می تواند نشان دهنده بهبود گوارش پذیری مواد خوراکی با افزودن این ترکیبات باشد.

واژگان کلیدی: تخمیر شکمبه، سیر، اکالیپتوس، شرایط برون تنی

مقدمه

تغذیه نشخوارکنندگان در شرایط فعلی و به صورت سیستم های متراکم برای تولید گوشت و محصولات لبنی، نیازمند تامین سطوح بالایی از انرژی و پروتئین در جیره اند، به این ترتیب این حیوانات به جیره غنی از نشاسته و پروتئین با کیفیت بالا در جیره وابسته اند. این مواد مغذی به سرعت در شکمبه تخمیر شده و تولید گاز می کنند. بنابراین هر گونه تلاش جهت بهبود بازدهی خوراک می تواند بر این صنعت تاثیر گذار باشد. بیشتر حجم گاز تولید شده در شکمبه شامل دی اکسید کربن و متان می باشد(Dehority, 2003). متان تولیدی توسط نشخوارکنندگان مسئول هدر روی ۲ تا ۱۵درصد از انرژی متابولیسمی این حیوان بوده و همچنین اثرات مهمی در تشکیل گازهای گلخانه ای دارند. کاهش تولید متان می تواند عملکرد این حیوانات را بهبود داده و اثرات گلخانه ای آنها را کاهش دهد. مطالعات زیادی که با استفاده از گیاهان مختلف دارویی از جمله نعناع فلفلی(Agarwal et al, 2009)، اکالیپتوس(Sallam et al, 2010)، آویشن(Castillejos et al, 2008) و دارچین(Fraster et al, 2007) صورت گرفته است نشان داده است که افزودن این ترکیبات تخمیر میکروبی شکمبه را از طریق کاهش غلظت آمونیاک به واسطه تاثیر آنها بر باکتری های تولید کننده آمونیاک و در نتیجه کاهش دآمیناسیون اسیدهای آمینه، کاهش تجمع متان، تعداد تک یاخته ها و تغییر نسبت مولی SCFA بهبود می دهند(Soltan et al, 2011; Sallam et al, 2012). مهمترین اثر ترکیبات فعال گیاهی خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی آنها می باشد. این ترکیبات به علت دارا بودن خاصیت چربی دوستی با اتصال مستقیم به غشای سلول باکتری و یا غیر مستقیم با صدمه زدن به پروتئین های غشای سلولی موجب تخریب غشای پلاسمایی باکتری شده و با تغییر سیالیت غشای پلاسمایی موجب تجزیه سلول می شوند(Burt, 2004). لذا هدف از آزمایش حاضر تعیین بهترین سطح گیاهان مختلف برای انجام آزمایشات تخمیر در شرایط برون تنی بود.

مواد و روش ها

اثر سه مقدار(۵، ۱۰ و ۱۵درصد ماده خشک کنسانتره) از هر کدام از دو گیاه دارویی شامل سیر($G_{۵}$،$G_{۱۰}$،$G_{۱۵}$) و اکالیپتوس($E_{۵}$،$E_{۱۰}$،$E_{۱۵}$) بر فراسنجه های تخمیر شکمبه مورد بررسی قرار گرفت. تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از فشارسنج و بطری های شیشه ای محتوی بزاق مصنوعی مطابق با روش منک و استینگاس(۱۹۸۷) و مایع شکمبه صاف شده به نسبت ۲ به ۱، به مقدار ۳۰ میلی لیتر ، و ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک از نمونه آسیاب شده با چهار تکرار انجام گرفت. همچنین به منظور تصحیح میزان گاز تولید شده توسط ذرات باقیمانده در مایع شکمبه ۵ تکرار مایع شکمبه به عنوان بلنک در نظر گرفته شد. برای انجام این آزمایش مایع شکمبه مورد نیاز از سه راس گاو فیستوله شده هلشتاین به طور تقریبی در یک زمان مشخص (بین ساعت های ۸ و ۹) جمع آوری شد. خوراک پایه مورد استفاده شامل جیره ۶۰ به ۴۰ کنسانتره- علوفه (مطابق نیازهای گاو شیری پرتولید) بود. مایع شکمبه با چهار لایه صاف شده و به آزمایشگاه منتقل شد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد مورد انکوباسیون قرار گرفت تا تولید گاز صورت گرفته و ذرات درشت در قسمت بالایی فلاسک ها شناور شوند. جهت اطمینان از شرایط

بی هوازی مایع شکمبه صاف شده گاز دی اکسید کربن به آن تزریق شد و قبل از استفاده جهت انکوباسیون در حمام آب گرم ۳۹ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در نهایت درب شیشه ها با استفاده از درپوش لاستیکی و پوشش آلومینیومی به طور کامل بسته شدند و در حمام بن ماری با دمای ۳۹ درجه قرار گرفتند فشار گاز تولید شده در زمان های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت شدند و حجم گاز تولید شده در هر زمان بر اساس فشار اندازه گیری شده محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل داده های تولید گاز با کمک معادله ارسکوف- مکدونالد (۱۹۷۹) $P = b\,(1-e^{-ct})$ انجام خواهد گرفت. در این رابطه P میلی لیتر گاز تولید شده به ازای هر گرم ماده آلی انکوباسیون شده(میلی لیتر در گرم ماده خشک)، b تولید گاز از بخش تولید گاز(میلی لیتر)، c سرعت تولید گاز در زمان t(ساعت) در نظر گرفته خواهد شد. در ساعت ۲۴ آزمایش از هرکدام از تیمارها دو تکرار به منظور اندازه گیری میزان متان تولیدی مورد آنالیز قرار گرفتند و حجم متان تولیدی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

متان تولیدی(ml)= کل گاز تولیدی × درصد متان در نمونه

در نهایت میزان تغییر در حجم متان تولید در تیمار های مختلف نسبت به تیمار شاهد با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

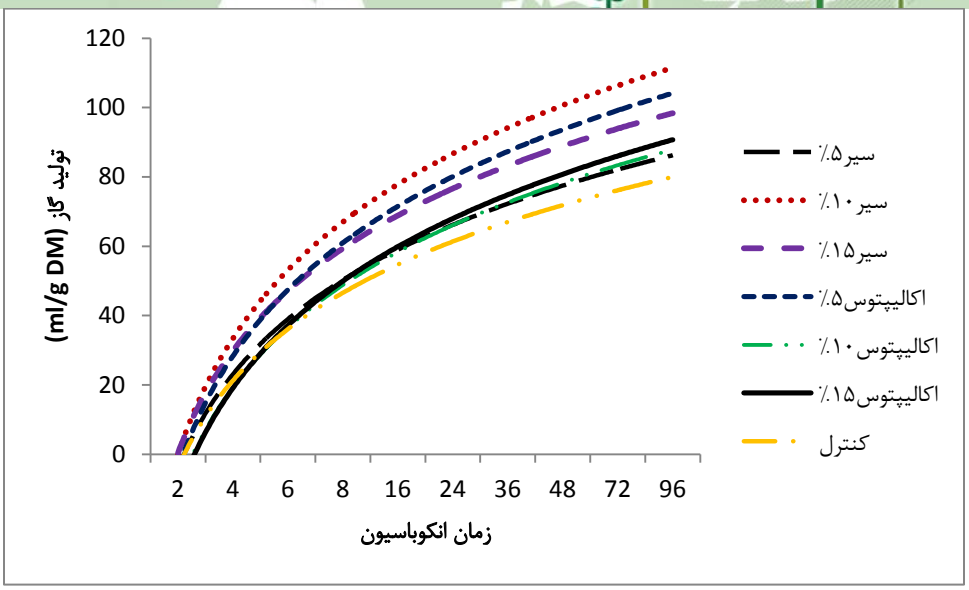
نتایج در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم افزار آماری SAS 9.1 آنالیز شدند. اختلاف تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از روش دانکن مورد بررسی قرار گرفتند. مدل آماری مورد استفاده در این طرح به صورت زیر بود.

$$Y_{ij}=\mu+D_i+e_{ij}$$

در این مدل Y_{ij}مشاهده، μ: میانگین هر فراسنجه، D_i اثر سطوح گیاهان و e_{ij} خطای آزمایشی است.

نتایج و بحث

شکل۱ نتایج تیمارهای آزمایشی بر روند تولید گاز سطوح مختلف گیاهی در آزمایش را نشان می دهد. در تمامی سطوح آزمایش میزان گاز تولید شده در مقایسه با کنترل به طور معنی داری افزایش یافت($p<۰/۰۱$). در مقایسه سطوح مختلف تیمارها با هم بیشترین تولید گاز در تیمار G_{10} مشاهده گردید. منک و استینگاس(۱۹۸۷) نشان دادند که میزان گاز تولید شده با تخمیر پذیری مواد خوراکی رابطه مستقیم دارد و هرچقدر میزان تخمیر پذیری بیشتر باشد میزان گاز تولید شده نیز بیشتر است. بنابراین افزایش میزان گاز تولید شده در تیمارها با افزودن سطوح مختلف گیاهان دارویی می تواند نشان دهنده بهبود گوارش پذیری مواد خوراکی با افزودن این ترکیبات باشد.



شکل۱:اثرسطوح مختلف سیر و اکالیپتوس بر تولید گاز بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون

به طور کلی اثر مقدارهای متفاوت گیاهان دارویی سیر و اکالیپتوس در سطوح پایین باعث افزایش تولید گاز گردیدند هرچند که با افزایش درصد تیمارها در جیره میزان گاز تولید شده شروع به کاهش نمود. این اثر کاهشی در صورت افزودن سطوح تیمارها می تواند به علت فعالیت ضد باکتریایی ترکیبات موجود در این گیاهان بر میکروارگانیسم های شکمبه باشد(کنگ مون و همکاران، ۲۰۱۰). پاترا و همکاران(۲۰۰۶) نیز با آزمایش برون تنی نشان دادند که افزودن گیاهان و عصاره های آنها تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی را افزایش می دهند.

اثرانکوباسیون ۲۴ ساعته افزودن گیاهان دارویی سیر و اکالیپتوس سوبسترای با مقادیر مختلف گیاهان دارویی بر تولید گاز و متان و تغییرات آنها نسبت به شاهد در جدول ۱ آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود افزودن مقادیر مختلف گیاهان دارویی سیر و اکالیپتوس باعث افزایش معنی دار میزان گاز تولیدی در ۲۴ ساعت نسبت به تیمار شاهد گردیده است. مشاهدات نشان داد درصد گاز متان نسبت به کل گاز تولیدی در تیمارهای حاوی سطوح مختلف گیاهان دارویی کاهش یافته است. به طوری که درصد این کاهش نسبت به خوراک پایه در برخی از تیمارها به بیش از ۴۰درصد رسیده است(E_{15}و E_{10}). این گیاهان به احتمال زیاد دارای ترکیباتی موثر برای کاهش متان بوده اند(Garcia-Gonzalez et al., 2005). به عقیده بنچار و همکاران (۲۰۰۸) مواد موثر موجود در این گیاهان می توانند از طریق اختلال در مکانیسم های انتقال الکترون، تغییر در غلظت یون های سلولی، انتقال پروتئین، فسفریلاسیون و دیگر واکنش های آنزیمی سبب تخریب سلول باکتری های متانوژن و همچنین تخریب سلول پروتوزآ و به دنبال آن کاهش هیدروژن تولیدی شوند. ایوانز و مارتین(۲۰۰۰)که با سطوح ۴۵، ۹۰، ۱۸۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اثرات تیمول آویشن بر اسیدهای چرب ، pH و غلظت متان را مورد بررسی قرار دادند، گزارش نمودند کاربرد ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تیمول غلظت اسیدهای چرب فرار را تغییر داده و سبب افزایش pH و نسبت استات به پروپیونات می شود اما متان

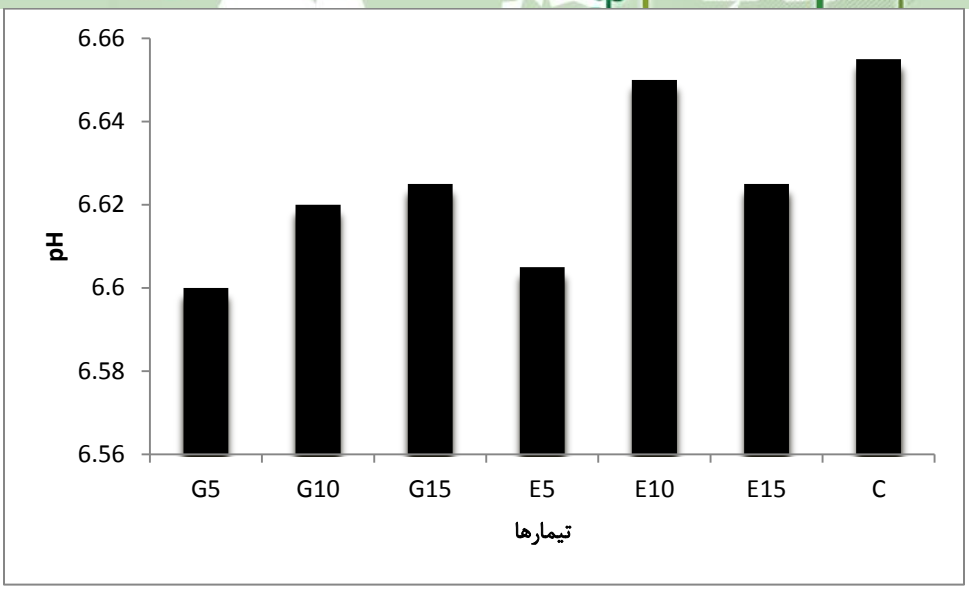
تولیدی، غلظت استات، پروپیونات و لاکتات کاهش یافت. آنها گزارش نمودند که تیمول در متابولیسم انرژی باکتری های استرپتوکوکوس بوویس و سالمونلا رومینانتیوم تاثیر گذار است. آنها بیان نمودند که تیمول موجود در آویشن از طریق مهار جذب گلوکز توسط باکتری، توانایی مهار تولید متان در باکتری ها را دارد. همچنین بنچار و گریت هد(۲۰۱۱) گزارش نمودند ترکیبات موجود در آویشن توانایی تجمع در غشای پلاسمایی سلول باکتری را داشته و سبب پاره شدن این غشا و تراوش یون ها می شوند.

جدول۱: اثر مقادیر مختلف گیاهان سیر و اکالیپتوس بر تولید گاز(میلی لیتر/ گرم در روز) و تولید متان(میلی لیتر)بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون

تیمار	فراسنجه ها					
	مقادیر٪	گاز تولیدی	٪تغییر گاز تولیدی	متان	٪متان	٪تغییر متان
کنترل	-	۵۷/۶^{c}	-	۶۳/۰^{a}	۲۲	-
	۵	۶۲/۵^{bc}	۸/۵	۶۳/۵^{e}	۱۵	۳۱/۸۱
سیر	۱۰	۸۱/۵^{a}	۴۱/۴	۴۰/۰^{d}	۱۴	۳۶/۳۶
	۱۵	۷۲/۴^{ab}	۲۵/۷	۵۴/۴^{b}	۱۷	۲۷/۷۲
	۵	۷۷/۶^{a}	۳۴/۷	۴۹/۱^{c}	۱۷	۲۲/۷۲
اکالیپتوس	۱۰	۶۳/۳^{bc}	۹/۸	۴۵/۹^{c}	۱۳	۴۰/۹۱
	۱۵	۶۱/۵^{bc}	۶/۷۷	۴۶/۱^{c}	۱۳	۴۰/۹۱
اشتباه معیار میانگین ها*		۲/۲۵		۲/۲۹		
مقدار احتمال**		۰/۰۰۱		<۰/۰۱		

*SEM **p-value

در آزمایش سلام و همکاران(۲۰۰۹) که اثر اکالیپتوس با مقادیر ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر بر تخمیر شکمبه و متان تولیدی در شرایط برون تنی را مورد مطالعه قرار دادند، مشخص شد با افزودن سطوح اکالیپتوس میزان متان تولیدی کمتر شد. آنها بیان نمودند که ترپن های موجود در این گیاه مسئول کاهش میزان گاز متان تولیدی باشد زیرا ترپن ها مهارکننده پروتوزا و باکتری های متانوژن هستند. وجود اسیدهای چرب بلند زنجیر از جمله C18 در اکالیپتوس نیز میتواند مسئول کاهش متان تولیدی در شکمبه باشد. کاهش در CH_4 تولیدی با افزودن اسیدهای چرب غیر اشباع می تواند به دلیل پذیرش الکترون این اسیدهای چرب در طی عمل بیوهیدروژناسیون باشد. اسیدهای چرب بلند زنجیر تخمیر نمی شوند بنابراین میزان متان تولیدی کاهش می یابد. میرزایی و همکاران(۲۰۱۲) نشان دادند که روغن سیر و ترکیبات موجود در آن می توانند سبب کاهش متان(CH_4) شوند. اگرچه مکانیسم کاهش متان تولیدی در شکمبه بوسیله سیر بخوبی شناخته نشده است اما می تواند به علت اثر بازدارندگی ترکیبات سولفوره(تیول دی سولفید) بر آنزیم HMG-COa ردوکتاز باشد(Gebhardt and Beck, 1996). باسکوئت و همکاران(۲۰۰۵) نیز کاهش تولید متان با کاربرد روغن سیر در جیره را به ممانعت مستقیم این ترکیبات ار فعالیت میکروارگانیزم های آرکی نسبت دادند.



شکل۲: اثر مقادیر مختلف سیر و اکالیپتوس بر تغییرات pH نهایی مایع شکمبه با خوراک ۴۰ درصد علوفه و ۶۰ درصد کنسانتره بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون

اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان تغییرات pH شکمبه پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. اگرچه آنالیز آماری این داده ها تفاوت معنی داری را نشان نداد ولی به لحاظ عددی استفاده از گیاهان دارویی توانسته بودند میزان pH را تا حدی کاهش دهند. نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد گیاهان دارویی سیر و اکالیپتوس می توانند تخمیر شکمبه ای را تحت تاثیر قرار داده و اثرات ضد میکروبی انها وابسته به میزان مورد استفاده انها در جیره قرار می گیرند.

References

Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L. C., & Kamra, D. N. (2009). Effect of peppermint oil on *in vitro* methanogensis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol., 148*, 321-327.

Benchaar, C. & Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Animal Feed Science and Technology, 166– 167, 338– 355.

Benchaar, C., S. Calsamiglia, A. V. Chaves, G. R. Fraser, D. Colombatto, T. A. McAllister and K. A.Beauchemin. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Anim. Feed Sci. Technol. 145:209–228.

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: areview. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P. W. Cardozo and C. Kamel. (2005). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. J. Dairy Sci. 88:2508–2516.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martín-Tereso, J., & Ter Wijlen, H. (2008). *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal feed science and technology*, *145*(1), 259-270.

Dehority, B. A. (2003). Rumen Microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Evans, J.D. and S.A. Martin, (2000). Effects of thymol on ruminal microorganisms. Curr. Microb., 41: 336-340

Fraser, G. R., Chaves, A. V., Wang, Y., McAllister, T. A., Beauchemin, K. A., & Benchaar, C. (2007). Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. *J. Dairy Sci.*, *90*, 2315-2328.

Garcia-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M. & Gonzalez, J. S. (2005). Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). In: Soliva, C. R., Takahashi, J., Kreuzer, M. (Eds.), Proceedings of the 2nd International Conference of Greenhouse Gases and Animal Agriculture. ETH Zurich, Zurich, Switzerland, Pp. 444–447.

Gebhardt, R. and H. Beck, (1996). Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. Lipids, 31: 1269-1276.

Menke, K. H. and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research and Development. 28:7-55.

Mirzaei, A., Syadati, S. A. and H. Fathi. (2012). Some of thyme (Thymus vulgaris) properties in ruminant's nutrition. Annals of Biological Research, 3 (2):1191-1195.

Ørskov, E. R., and I. McDonald. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to the passage rate. J. Agric. Sci. 92: 499-503.
Patra AK, Kamra DN, Agarwal N (2006) Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. Anim Feed Sci Technol 128:276–29.

Sallam, S. M. A, Bueno, I. C. S., Nasser, M. E., & Abdalla, A. L. (2010). Effect of eucalyptus (*Eucalyptuscitriodora*) fresh or residue leaves on methane emission *in vitro*. *Ital. J. Anim. Sci.*, *9*, 299-303.

Sallam, S. M. A., Morsy, A. S., Soltan, Y. A., Alencar, S. M., & Abdalla, A. L. (2012). Antimethanogenic activity of commercial essential oils products. *Proc. 14 t hInt. seminar of FAO-CIHEAM Sub-Network on sheep &Goat Nutrition and 2 nd Symp*. Low input Breeds. Feeding and management strategies to improve Livestock Productivity, Welfare and product Quality Under Climate Changes. May 15-18, 2012.

Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Araujo, R. C., Elziat, H. M., Sallam, S. M. A. Louvandini, H., & Abdalla, A. L. (2011). Carvacrol and eugenol as modifiers of rumen microbial fermentation and methane production *in vitro*. *Proc. Of 4th Animal Wealth Research Conference in the middle East and North Africa* (pp. 354-364).