



## Original Research Paper

## Effect of using enzyme and Lactic acid bacterial inoculant on digestibility, protozoa population and Methane production(CH<sub>4</sub>) of tomato pomace and pumpkin waste silage

*Esmail Ganji Jameh Shooran*<sup>1</sup>, *Kaveh Jafari Khorshidi*<sup>1\*</sup>, *Javad Bayat Kouhsar*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ghaemshahr Branch, Islamic Azad University, Ghaemshahr, Iran

<sup>2</sup> Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

### Key Words

Tomato Pomace Silage  
Pumpkin Waste Silage  
Enzyme  
Bacterial Inoculant  
Fermentation

### Abstract

**Introduction:** This study was conducted to evaluate the effects of enzymes and lactic acid bacterial inoculant on the digestibility, methane production and protozoa population silage mix of tomato pomace and pumpkin waste.

**Materials & Methods:** Representative of samples were packed manually, in triplicate into plastic bags and were stored at ambient temperature and allowed to ensile for 90 days. The following treatments were applied to the forage samples: 1) tomato pomace and pumpkin waste silage mix (50:50), without any additives (control), 2) control + LAB made inoculant ( $8 \times 10^9$  CFU/ml), 3) control + fibrolytic enzyme and 4) control + Fibrolytic Enzyme+ LAB made inoculants.

**Results:** The results showed partitioning factor between experimental treatments showed significant difference ( $P < 0.035$ ), that the most parsing factor was related to enzyme additive treatment. No significant difference was seen between parsing treatments in terms of microbial mass production and gas production efficiency ( $P > 0.05$ ). But, microbial protein production efficiency was significantly different ( $P < 0.05$ ). In terms of protozoa population, there was a significant difference between experimental treatments of total population and halotric ( $P < 0.05$ ). But, in the population of Antonium, Diplodinium, Africavasculus, the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). Methane production in total gaseous production and MRP was significantly different ( $P < 0.05$ ). But, there was no significant difference in methane ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** Overall, the results showed that the use of various additives had no significant effect on the nutritional value of the silage of the mixture of tomato pomace and pumpkin waste compared to the control treatment.

\* Corresponding Author's email: [kaveh.khorshidi@gmail.com](mailto:kaveh.khorshidi@gmail.com)

Received: 1 April 2022; Reviewed: 5 May 2022; Revised: 10 July 2022; Accepted: 18 August 2022

(DOI): 10.22034/AEJ.2022.353567.2854

## مقاله پژوهشی

## تأثیر افزودن آنزیم و باکتری‌های مولد اسید لاکتیک بر قابلیت هضم، تولید متان و جمعیت پروتوزوآ سیلاژ تفاله گوجه فرنگی و بقایای کدو آجیلی

اسماعیل گنجی‌جامه‌شوران<sup>۱</sup>، کاوه جعفری‌خورشیدی<sup>۱\*</sup>، جواد بیات کوهسار<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

<sup>۲</sup> گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

## چکیده

## کلمات کلیدی

**مقدمه:** این پژوهش به منظور بررسی تأثیر افزودنی آنزیم و باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک بر قابلیت هضم، تولید متان و جمعیت پروتوزوآ سیلاژ مخلوط تفاله گوجه فرنگی و ضایعات کدو آجیلی انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) مخلوط تفاله گوجه فرنگی و بقایای کدو آجیلی به نسبت ۱:۱ (به‌عنوان شاهد)، (۲) شاهد+ آنزیم، (۳) شاهد+افزودنی باکتریایی تولید شده در آزمایشگاه و (۴) شاهد+آنزیم+افزودنی باکتریایی، بودند. تیمارهای آزمایشی در سه تکرار در کیسه‌های نایلونی به وزن ۳ کیلوگرم به صورت دستی فشرده و به مدت ۹۰ روز سیلو شدند. قابلیت هضم تیمارهای مختلف براساس روش کشت بسته، شمارش جمعیت پروتوزوآ از محلول MFS (متیل‌گرین، فرمالین، سیلین) و همچنین جهت برآورد تولید گاز متان از روش آزمون تولید متان استفاده شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد عامل تفکیک بین تیمارهای آزمایشی متفاوت بود ( $P < 0/035$ ) که بیش‌ترین عامل تفکیک مربوط به تیمار افزودنی آنزیم بود. در تولید توده میکروبی و بازده تولید گاز بین تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0/05$ ). بازده تولید پروتئین میکروبی اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ( $P < 0/05$ ). از نظر جمعیت پروتوزوآ بین تیمارهای آزمایشی جمعیت کل و هالوتریش‌ها اختلاف آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). ولی در جمعیت آنتودینیوم، دیپلودینیوم، افریواسکولکس، اختلاف آماری معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). از نظر تولید متان در فاکتور کل گاز تولیدی و پتانسیل کاهش تولید متان اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). ولی از نظر متان اختلاف آماری معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** به‌طور کلی، نتایج نشان داد که استفاده از افزودنی‌های مختلف در مقایسه با تیمار شاهد تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر ارزش تغذیه‌ای سیلاژ مخلوط تفاله گوجه فرنگی و ضایعات کدو آجیلی نداشتند.

## مقدمه

در سالیان اخیر، صنایع لبنی و پروتئینی به دلیل افزایش جمعیت، بالا رفتن فرهنگ تغذیه و مصرف شیر و گوشت از گسترش قابل توجهی برخوردار بوده است. در پاسخ به این نیاز، واحدهای صنعتی دامداری نیز رشد زیادی داشته‌اند که افزایش واحد دامی از یک طرف و استفاده بی‌رویه از مراتع از طرف دیگر باعث کمبود علوفه و مواد غذایی مورد نیاز دام گردیده، لذا استفاده از بقایای کارخانجات خوراکی به عنوان محصولات فرعی در تغذیه دام اهمیت زیادی پیدا کرده و دارای چندین مزیت مهم می‌باشد: اول این که تغذیه این محصولات باعث کاهش وابستگی دام‌ها به غلات (قابل مصرف توسط انسان) می‌شود. دوم این که هزینه‌های اضافی برای برنامه‌های مدیریتی را حذف می‌کند که در سال‌های اخیر به دلیل افزایش جمعیت جهان و ضایعات کشاورزی به خصوص در کشورهای در حال توسعه دارای اهمیت زیادی می‌باشد (۱). از طرفی استفاده از ضایعات می‌تواند از آلودگی محیط زیست جلوگیری کند و باعث افزایش ارزش ضایعات و محصولات فرعی تولیدات کشاورزی گردد (۲). از مهم‌ترین فرآورده‌های فرعی کشاورزی در استان گلستان بقایای کدو آجیلی و تفاله گوجه فرنگی می‌باشد. تفاله گوجه فرنگی به عنوان یک منبع خوب الیاف، ویتامین B، لیکوپن، پروتئین و چربی در تغذیه نشخوارکنندگان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد که فاقد فاکتورهای ضد تغذیه‌ای می‌باشد (۳). میزان پروتئین آن ۲۱/۹ تا ۲۳/۷ درصد بوده که درصد لیزین به پروتئین در آن نسبت به کنجاله سویا بیش‌تر می‌باشد و می‌تواند به‌طور اساسی کیفیت خوراک‌های با لیزین پایین مانند محصولات غلات را بهبود بخشد (۴). تفاله گوجه فرنگی دارای چربی قابل ملاحظه‌ای (۱۵-۱۰ درصد ماده خشک) بوده که بیش‌تر آن به صورت اسیدهای چرب غیراشباع و ضروری (لینولئیک اسید، اولئیک اسید و لینولنیک اسید) بوده (۵)، محتوای چربی حتی می‌تواند از ۲۰ درصد فراتر رود، اگر نسبت دانه زیاد باشد (۶) و فاقد لپازها و مواد سمی می‌باشد. مقادیر الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی آن به ترتیب در دامنه ۵۰-۷۲ و ۳۹-۶۰ درصد ماده خشک قرار داشته و محتوای لیگنین آن ۳۰-۲۰ درصد ماده خشک (۷) بوده که توجه به آن بسیار مهم است، اگرچه برخی از تفاله‌های گوجه فرنگی حاوی کم‌تر از ۷ درصد ماده خشک لیگنین توصیف شده‌اند (۸). بر طبق آمار FAO میزان تولید انواع کدو در ایران ۵۰۵ هزار تن بوده و از این لحاظ مقام نهم جهان را دارد (۹) در ایران سطح زیر کشت کدو آجیلی بالاست

(۱۰). سطح زیر کشت کدو آجیلی در کشور و استان گلستان به ترتیب ۱۶۰۰۰ و ۱۴۹۴ هکتار و عملکرد آن ۴۰-۳۰ تن در هکتار می‌باشد (۱۱). کدو علاوه بر آن که می‌تواند به عنوان غذای انسان مصرف شود می‌تواند به عنوان خوراک دام نیز مورد استفاده قرار گیرد (۱۰). کدو دارای ۹ درصد ماده خشک، ۱۶ درصد پروتئین خام، ۱۴ درصد الیاف خام و ۵۸ درصد کل مواد مغذی قابل هضم (۱۲)، ۲/۶ درصد گلوکز، ۲ درصد سلولز و همی سلولز، ۰/۹ درصد فروکتوز، ۰/۵ درصد ساکارز، ۵/۵ درصد پکتین، ۴/۵ درصد اسیدلینولئیک که عمده‌ترین اسید چرب در روغن دانه آن و ویتامین‌های C, B, E و کاروتنوئیدها می‌باشد (۱۳). کدو علاوه بر آن که می‌تواند به عنوان غذای انسان مصرف شود می‌تواند به عنوان خوراک دام نیز مورد استفاده قرار گیرد (۱۰). به دلیل بالای بودن مواد مغذی مختلف و رطوبت بالا (۹۰-۸۸۶ درصد) و تولید در ماه‌های گرم سال هر دو محصول به سرعت آلوده به کپک می‌شوند و شرایط مناسبی را برای رشد و ازدیاد حشرات عوامل بیماری‌زا فراهم می‌کنند. به همین دلیل مصرف آن به شکل تازه بیش‌تر از یک شبانه روز میسر نبوده و باید سریع مصرف گردند. لذا روش سیلو کردن برای نگهداری آن‌ها عملی‌تر می‌باشد. نگهداری علوفه به صورت سیلاژ روشی مرسوم در تامین منابع غذایی نشخوارکنندگان در مدت زمانی از سال است که علوفه تازه در دسترس نیست که در آن علوفه مرطوب را در یک محیط بی‌هوازی و اسیدی حفظ و ذخیره‌سازی می‌کنند (۱۴). در این روش در اثر فعالیت باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک تحت شرایط بی‌هوازی، کربوهیدرات‌های محلول در آب علوفه به اسیدهای آلی عمدتاً اسیدلاکتیک تبدیل و باعث کاهش pH و در نتیجه محافظت علوفه از فساد میکروبی می‌گردد (۱۵). با توجه به ویژگی‌های بقایای کدو آجیلی به خاطر مقادیر بالای کربوهیدرات محلول و تفاله گوجه فرنگی به خاطر میزان بالای پروتئین خام ترکیب این دو در تهیه سیلاژ از روند تخمیر در سیلو به شکل بهتری حمایت می‌کند. افزودنی‌های بسیاری برای استفاده در سیلاژ به منظور افزایش ترکیبات مغذی سیلاژ، کاهش سریع اسیدیته، جلوگیری از هدر روی محتوی سیلویی و افزایش پایداری هوازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۶). این افزودنی‌ها شامل انواع مختلف شیمیایی و بیولوژیکی می‌باشند. از انواع بیولوژیکی، افزودنی‌های باکتریایی هستند که در زمان سیلو کردن به علوفه اضافه شده و حاوی باکتری‌های اسیدلاکتیک تخمیر همگن یا ناهمگن می‌باشند (۱۷). آنزیم‌های گوارشی پستانداران وظیفه هضم غذا را بر عهده دارند. تمام ترکیبات موجود در خوراک‌ها به وسیله این آنزیم‌ها تجزیه نمی‌شوند، از این رو احتمالاً برخی مواد مغذی غیر قابل دسترس

اتاق نگهداری شدند. درب سیلوها پس از سپری شدن زمان معین، باز و نمونه‌ها با هم مخلوط شدند و در نهایت از سطوح پایینی، میانی و بالایی سیلو نمونه‌برداری گردید.

**آماده‌سازی تلقیح باکتریایی:** تلقیح باکتریایی شامل مخلوطی از لاکتوباسیلوس کازئی PTCC1608، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643، لاکتوباسیلوس پلانتروم PTCC1058، پدیوکوکوس پنتوزاسئوس PTCC1426 و انتروکوکوس فوزیوم PTCC1238 بود. که از سازمان علمی صنعتی ایران خریداری شده بود. کشت‌های خالص باکتریایی به شکل خشک انجمادی در درون ظروف شیشه‌ای قرار گرفته و به‌صورت انفرادی در لوله‌های حاوی ۱۰ سی‌سی از محیط کشت MRS برات (Merck, KGaA Germany) بعد از کشت لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. از روش پلت کانت برای شمارش جمعیت کشت‌های باکتریایی بعد از انکوباسیون استفاده شد. ابتدا رقت‌های مختلفی تا ۱۰ برابر (محلول استریل‌سیلین) تهیه و رقت‌های ۶ تا ۱۰ روی پلت‌های حاوی محیط کشت به‌علاوه ۱/۵ درصد آگار کشت داده شده و در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت گذاشته شدند.

**برآورد قابلیت هضم در شرایط برون تنی:** قابلیت هضم تیمارهای مختلف براساس روش کشت بسته اندازه‌گیری شد (۲۰). برای این کار، نمونه‌ها ابتدا به ذراتی به قطر یک میلی‌متر آسیاب و در نهایت خشک شدند. مقدار ۰/۵ گرم از هر نمونه داخل هر یک از ظروف شیشه‌ای ریخته و سپس ۵۰ سی‌سی از مخلوط بزاق مصنوعی و مایع شکمبه به نسبت ۲ به ۱ (حجم بزاق مصنوعی و ۱ حجم مایع شکمبه) به‌داخل هر ظرف شیشه‌ای افزوده شد (۲۱). در ادامه به‌داخل هر کدام از ظروف شیشه‌ای به مدت ۱۰ ثانیه گاز CO<sub>2</sub> تزریق کرده و درب آن توسط درب لاستیکی و درپوش آلومینیومی به‌طور کامل بسته شد. ظروف شیشه‌ای بعد از قرار گرفتن داخل بن ماری با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد در موقعیت‌های زمانی خاص و مساوی تکان داده می‌شدند. همه ظروف شیشه‌ای بعد از گذشت ۲۴ ساعت از بن‌ماری خارج و به‌ظرف حاوی یخ منتقل شدند و با استفاده از پارچه مخصوص نمونه‌های موجود در هر ظرف شیشه‌ای ابتدا صاف شده و سپس باقی‌مانده گوارش نشده از فاز مایع جدا شد. در نهایت pH فاز مایع نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. بخش باقی‌مانده گوارش نشده هر ظرف شیشه‌ای جمع‌آوری و داخل کروزه‌های با وزن معین منتقل شد. کروزه‌ها در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند تا این‌که وزن خشک نمونه‌های حذف شده مشخص گردد. در نهایت کروزه‌های حاوی باقی‌مانده مواد گوارش نشده، به مدت ۶ ساعت در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. این عمل برای به‌دست آوردن مقدار

می‌باشند. ساختمان شیمیایی سلول‌های گیاهی، زمان محدود در دسترس برای فعالیت در بخش‌هایی خاص از دستگاه گوارش و وجود ترکیبات ضد تغذیه‌ای در برخی خوراکی‌ها باعث تاخیر در آزادسازی مواد مغذی می‌شوند. آزمایش‌های اولیه با مکمل‌های آنزیمی به‌منظور غلبه بر این محدودیت‌ها، پاسخ‌های متغیری در پی داشته که عمدتاً دلیل آن ناخالص بودن مواد بوده است. در نتیجه پیشرفت‌های به‌دست آمده در زیست فناوری، اکنون تولید انبوه و نسبتاً کم هزینه آنزیم‌های موثر امکان‌پذیر گردیده است. از این‌رو، مکمل‌سازی جیره به‌عنوان ابزاری برای بهبود ارزش غذایی، به‌تدریج به‌صورت رویه‌ای معمول در می‌آید (۱۸). افزودن آنزیم فیبرولایتیک به سیلو به‌منظور تجزیه لیاف به کربوهیدرات محلول در آب (WSC: Water Soluble Carbohydrate) برای تخمیر باکتری‌های اسیدلاکتیک صورت می‌گیرد (۱۹) این آنزیم‌ها کیفیت تخمیر و ماده خشک قابل هضم سیلو را بهبود می‌دهند. لذا، هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر استفاده از افزودنی‌های باکتریایی و آنزیمی بر قابلیت هضم، تولید متان و جمعیت پروتوزوآ سیلاژ تفاله گوجه فرنگی و بقایای کدو آجیلی بود.

## مواد و روش‌ها

**تهیه سیلاژ:** بقایای کدو آجیلی از مزارع استان گلستان و تفاله گوجه فرنگی مورد نیاز از کارخانه رب گوجه فرنگی دلدن تهیه گردید. بقایای کدو آجیلی پس از جدا کردن دانه به ذراتی به اندازه‌های ۲ تا ۳ سانتی‌متری برش خورده و نمونه‌ها به‌سرعت برای تهیه سیلاژ در شرایط آزمایشگاهی به آزمایشگاه تغذیه دام، دانشکده کشاورزی گنبد کاووس منتقل شدند. بقایای کدو آجیلی و تفاله گوجه فرنگی برای رسیدن به ماده خشک مطلوب به مدت چند ساعت در آزمایشگاه پژمرده شدند. جهت تهیه سیلوهای آزمایشگاهی، ابتدا بقایای کدو آجیلی و تفاله گوجه فرنگی با نسبت ۱:۱ به‌خوبی باهم مخلوط شدند و در کیسه‌های پلاستیکی در سه تکرار به شکل دستی فشرده و سیلو گردیدند. تیمارها شامل: (۱) مخلوط بقایای کدو آجیلی و تفاله گوجه فرنگی به نسبت ۱:۱ (به‌عنوان شاهد)، (۲) شاهد+آنزیم (به‌مقدار ۳ گرم در کیلوگرم)، (۳) شاهد+افزودنی باکتریایی تولید شده در آزمایشگاه (۱۰<sup>۱۰</sup>×۸ CFU در هر گرم، یک میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم ماده خشک)، (۴) شاهد+آنزیم+افزودنی باکتریایی، بودند. پس از این‌که افزودنی‌ها در آب دیونیزه حل شدند، روی علوفه اسپری شدند. برای تیمار شاهد هم مقادیر مساوی از آب دیونیزه اسپری شد. سیلوهای پر شده پلاستیکی به مدت ۹۰ روز به شکل کاملاً بسته و در دمای

## نتایج

تأثیر استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی و فراسنجه‌های تخمیری سیلاژ مخلوط تفاله گوجه فرنگی و تفاله کدو در جدول ۱ نشان داده شده است. استفاده از افزودنی‌های باکتریایی و آنزیمی تأثیر معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده خشک و آلی نداشت. بالاترین مقدار عامل تفکیک (۴/۷۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و بازده تولید پروتئین میکروبی (۰/۵۴) مربوط به تیمار دارای افزودنی آنزیمی بود. بین تیمارهای آزمایشی از نظر مقدار تولید پروتئین میکروبی و بازده تولید گاز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). تأثیر استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی بر جمعیت پروتوزوای سیلاژ مخلوط تفاله گوجه فرنگی و تفاله کدو در جدول ۲ نشان داده شده است. استفاده از افزودنی‌های باکتریایی و آنزیمی بر جمعیت کل پروتوزوا و هالوتیریش‌ها موثر بود (P<۰/۰۵)، ولی بر جمعیت آنودینیوم‌ها، دیپلودینیوم‌ها و اهریواسکولکس تأثیر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). تأثیر استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی بر تولید متان در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان دادند که بین تیمارهای مختلف از نظر کل گاز تولیدی و پتانسیل کاهش متان تولیدی (جدول ۳) اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). هر چند از نظر درصد گاز متان هیچ اختلافی بین تیمارها وجود نداشت. تیمار دارای افزودنی آنزیمی بیش‌ترین پتانسیل کاهش تولید متان را در مقایسه با تیمار شاهد داشت. از نظر درصد تولید متان بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P<۰/۰۵). بالاترین و پایین‌ترین مقدار پتانسیل کاهش تولید متان مربوط به تیمارهای دارای افزودنی آنزیمی و باکتریایی بود (P<۰/۰۵).

خاکستر خام مواد گوارش نشده باقی‌مانده در کروزه‌ها صورت گرفت. از طریق روش فنل هیپوکلیت مقدار نیتروژن آمونیاکی نمونه‌ها مشخص شد (۲۲). برای قرائت جذب نوری از دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول موج ۶۳۰ نانومتر استفاده گردید. توده میکروبی تولید شده با استفاده از معادله پیشنهادی Blummel محاسبه گردید (۲۳):

$$MB = GP \times (PF - 2/2) \text{ (میلی‌گرم)}$$

MB: تولید توده میکروبی، GP: میزان تولید گاز خالص بعد از ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر)، PF: عامل تفکیک (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

عامل تفکیک برابر با نسبت میلی‌گرم ماده آلی حقیقی حذف شده بر میلی‌لیتر حجم گاز خالص تولیدی می‌باشد. بازده از طریق تقسیم توده میکروبی تولید شده بر مقدار ماده آلی حقیقی قابل تخمیر میزان توده میکروبی در پایان زمان انکوباسیون (۲۴ ساعت) محاسبه گردید.

**شمارش پروتوزوا:** برای شمارش پروتوزوا محلول MFS (متیل گرین، فرمالین، سیلین) تهیه شد. محلول MFS شامل ۱۰ میلی‌لیتر فرمالدئید ۳۵ درصد، ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۰۶ گرم متیل‌گرین و ۰/۸ گرم کلرید سدیم بود. سپس ۴ میلی‌لیتر از این محلول به یک میلی‌لیتر مایع شکمبه صاف شده اضافه شده و بعد از ۳۰ دقیقه شمارش پروتوزوا به وسیله میکروسکوپ نوری و با لام نئوبار آینه‌دار (براساس شکل و اندازه و وجود یا عدم وجود صفحه اسکلتی) و بزرگ‌نمایی ۴۰× انجام شد (۲۴).

**برآورد تولید گاز متان:** برای برآورد تولید گاز متان تیمارهای مختلف، از روش آزمون تولید متان استفاده شد (۲۵). تهیه محلول‌ها و آماده‌سازی نمونه‌ها طبق روش آزمون تولید گاز انجام گرفت. با این تفاوت که از بطری‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری و میزان ۱۲۵ میلی‌گرم نمونه استفاده شد. گاز تولید شده بعد از ۲۴ ساعت قرائت گردید و سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱۰ نرمال با کمک سرنگ به داخل بطری‌ها تزریق گردید و مجدداً مقدار گاز داخل هر بطری قرائت و در نهایت مقدار تولید گاز متان در ۲۴ ساعت برآورد گردید. اندازه‌گیری پتانسیل کاهش تولید گاز متان با استفاده از رابطه زیر انجام شد:

$$\text{گاز متان } 24 \text{ ساعت} / 100 \times \text{گاز متان } 24 \text{ ساعته } = CH_4$$

$$MRP = (100 \times \text{میانگین شاهد} / (CH_4) - \text{میانگین شاهد})$$

آنالیز داده‌های حاصل با رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (۲۰۰۳) نسخه ۹/۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

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

$Y_{ij}$ : مقدار مشاهده شده در هر صفت،  $T_i$ : اثر تیمار،  $\mu$ : میانگین هر صفت در جمعیت کل،  $e_{ij}$ : اثر خطای آزمایش

جدول ۱: تاثیر استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی و فراسنجه‌های تخمیری

تیمار	قابلیت هضم ماده خشک (درصد)	قابلیت هضم ماده آلی (درصد)	عامل تفکیک (میلی گرم بر میلی لیتر)	تولید توده میکروبی (میلی گرم بر گرم ماده خشک)	بازده تولید پروتئین میکروبی	تولید گاز (میلی لیتر در گرم ماده خشک)	pH	ازت آمونیاکی (میلی گرم در دسی لیتر)
شاهد	۴۵/۸۰	۴۷/۸۹	۴/۳۸ <sup>b</sup>	۱۱۰/۶۰	۰/۴۹ <sup>b</sup>	۲۲۴/۷۷	۶/۶۴ <sup>a</sup>	۰/۵۸ <sup>a</sup>
باکتری	۵۵/۱۰	۵۱/۱۲	۴/۵۷ <sup>ab</sup>	۱۱۹/۷۸	۰/۵۱ <sup>ab</sup>	۲۰۴/۲۶	۴/۴۳ <sup>bc</sup>	۰/۳۰ <sup>c</sup>
آنزیم	۴۷/۹۰	۴۹/۶۹	۴/۷۴ <sup>a</sup>	۱۲۰/۳۵	۰/۵۴ <sup>a</sup>	۲۱۰/۳۹	۶/۵۶ <sup>ab</sup>	۰/۵۲ <sup>b</sup>
باکتری+آنزیم	۴۹/۱۰	۵۱/۹۷	۴/۴۹ <sup>ab</sup>	۱۱۷/۸۰	۰/۵۱ <sup>ab</sup>	۲۱۸/۰۵	۶/۳۹ <sup>c</sup>	۰/۲۲ <sup>d</sup>
SEM	۵/۱۱	۴/۳۶	۰/۰۷	۱۰/۱۸	۰/۰۱	۱۰/۵۱	۰/۰۴۲	۰/۰۰۸۳
Pvalue	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۰۳۵	۰/۸۱	۰/۰۴	۰/۵۹	۰/۰۳۸	۰/۰۰۰۱

SEM میانگین خطای استاندارد. P-value: سطح احتمال معنی‌داری. میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ ).جدول ۲: تاثیر استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی بر جمعیت پروتوزوا ( $10^6 \times$  میلی لیتر)

تیمار	کل	هالوتریش	آنتودینیوم	دیپلودینیوم	افریواسکولکس
شاهد	۱/۸۰ <sup>b</sup>	۱/۴۰ <sup>b</sup>	۰/۲۰	۰/۲۰	.
باکتری	۲/۰۵ <sup>ab</sup>	۱/۶۳ <sup>ab</sup>	۰/۲۳	۰/۱۸	.
آنزیم	۲/۸۰ <sup>a</sup>	۲/۱۵ <sup>a</sup>	۰/۳۱	۰/۳۳	.
باکتری+آنزیم	۲/۱۸ <sup>ab</sup>	۱/۸۰ <sup>ab</sup>	۰/۲۰	۰/۱۸	.
SEM	۰/۲۶۳	۰/۱۸۱	۰/۰۷۵	۰/۰۹۶	.
P value	۰/۰۱۲۴	۰/۰۰۹۴	۰/۶۷۶	۰/۶۵۴	.

SEM: میانگین خطای استاندارد. P-value: سطح احتمال معنی‌داری. میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳: تاثیر استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی بر تولید متان (درصد)

تیمار	کل گاز تولیدی (میلی لیتر در هر گرم ماده خشک)	متان (درصد)	پتانسیل کاهش تولید متان (درصد)
شاهد	۱۱۷/۵۳ <sup>a</sup>	۲۸/۴۱	.
باکتری	۱۰۸/۴۳ <sup>b</sup>	۳۰/۴۳	۲/۷۱ <sup>b</sup>
آنزیم	۱۱۰/۲۳ <sup>ab</sup>	۲۷/۰۳	۱۸/۷۴ <sup>a</sup>
باکتری+آنزیم	۱۱۴/۱۶ <sup>ab</sup>	۲۸/۷۱	۱۰/۸۷ <sup>ab</sup>
SEM	۲/۴۲	۱/۱۰۹	۴/۳۱
P value	۰/۰۱۰۵	۰/۲۷۶	۰/۰۳۵

SEM: میانگین خطای استاندارد. P-value: سطح احتمال معنی‌داری.

## بحث

سیلاژ به کمک فرآیند طبیعی تخمیر و از طریق تولید اسید لاکتیک به دست می‌آید (۲۶). هدف از استفاده از افزودنی‌ها کمک به بهبود فرآیند سیلو کردن و حفظ مواد مغذی آن می‌باشد (۱۴). افزودنی‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و افزودنی آنزیم بوده است که افزودنی باکتریایی از طریق افزایش سرعت تخمیر و کاهش سریع pH، موجب پایداری سیلو گردید.

ضمن کاهش پروتئولیز، اتلاف قندهای محلول و دیگر مواد مغذی را کاهش می‌دهند. آنزیم‌ها نیز از طریق بهبود تجزیه‌پذیری فیبر و در دسترس قرار دادن بیش‌تر کربوهیدرات‌های محلول برای باکتری‌های سیلو در تهیه سیلاژ با کیفیت و ماندگاری بالا کمک می‌کنند (۲۷). در این مطالعه قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی در تیمارهای دارای افزودنی باکتریایی و آنزیمی در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور غیرمعنی‌داری بهبود یافت و بالاترین مقدار قابلیت هضم ماده آلی در تیمار دارای مخلوط هر دو افزودنی بود (۵۱/۹۷ درصد). در مطالعه Ganji Jamehshooran و همکاران نشان داده شد که استفاده از افزودنی



باکتریایی و آنزیمی باعث حفظ بیش‌تر پروتئین خام و کاهش بیش‌تر در مقادیر الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF: Acid Detergent Fiber) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF: Neutral Detergent Fiber) گشت (۲۹). به نظر می‌رسد که استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی در مقایسه با شاهد، مواد مغذی بیش‌تری را در سیلو حفظ کرده باشد. با این حال، عدم معنی‌داری را شاید نتوان به عدم تاثیر افزودنی‌ها در سیلو نسبت داد، چرا که محیط سیلو نیز می‌تواند تاثیرات افزودنی‌ها را متاثر سازد. در سیلاژهای دارای افزودنی سرعت افت در pH در مقایسه با سیلاژهای فاقد افزودنی بالاتر بوده و احتمالاً سریع‌تر به مرحله تثبیت وارد می‌شوند. از این رو می‌توان گفت که آنزیم‌ها و دیگر افزودنی‌ها فرصت کم‌تری برای هیدرولیز الیاف و سایر پیوندها دارند. لذا می‌تواند بر مقدار کربوهیدرات‌های ساختمانی تاثیر داشته باشد. در برخی از مطالعات هم تلفیح آنزیم‌های فیبرولایتیک و باکتری‌های اسیدلاکتیک در شرایط آزمایشگاهی قابلیت هضم سیلو را بهبود بخشیدند (۳۰). بالاترین مقدار عامل تفکیک، تولید پروتئین میکروبی و بازده تولید پروتئین میکروبی مربوط به تیمار دارای افزودنی آنزیمی بود (به ترتیب ۴/۷۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۲۰/۳۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک، ۰/۵۴ واحد). با این حال بین تیمارهای دارای افزودنی اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). عامل تفکیک در حقیقت مبین نسبت تجزیه واقعی سوبسترا به حجم گاز تولید شده در دوره زمانی انکوباسیون (۲۴ یا ۴۸ ساعت) بوده (۳۱) و شاخصی از راندمان تولید توده میکروبی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد (۲۳). در این مطالعه تیمار دارای افزودنی آنزیم از عامل تفکیک بالاتری برخوردار بود و ماده آلی بیش‌تری وارد ساختار میکروبی و تولید توده میکروبی شده که خود نشان‌دهنده بالا بودن بازده سنتز میکروبی می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهند که تیمارهای دارای افزودنی در مقایسه با تیمار شاهد بهتر به حفظ مواد مغذی کمک کرده‌اند. در مطالعه Bayat و Kohsar و همکاران تیمارهای پرایمینگ شده با اسیدسالیسیلیک و تلفیح شده دارای بالاترین عامل تفکیک بودند (۳۲). در تضاد با نتایج حاصل از این تحقیق در مطالعه کشاورز و همکاران سیلاژ قوییل جو در مقایسه با علوفه تازه از پتانسیل تولید گاز پایین‌تری برخوردار بود (۳۳). پروتوزوآ شکمبه سکونت‌گاه حدود ۲۰ درصد از باکتری‌های تولیدکننده متان بوده که در درون و بیرون از پروتوزوآ زندگی می‌کنند و مسئول تولید ۳۷ درصد از متان هستند. پروتوزوآ نقش منفی در مصرف نیترژن به‌وسیله نشخوارکنندگان دارند. پروتوزوآ تعداد زیادی از باکتری‌های شکمبه را بلعیده و هضم می‌کنند. بنابراین جریان پروتئین میکروبی را از شکمبه به دوازدهه کاهش می‌دهند (۳۴). در این مطالعه، جمعیت *افریواسکولکس* کلاً صفر و *دیپلودینیوم* معنی‌دار نبود. با این حال جمعیت کل و *هالوتریش‌ها* بین تیمارهای دارای اختلاف

معنی‌داری بود. در توافق با نتایج این تحقیق مطالعاتی که توسط Dehority در برزیل و پرو انجام شد، *افریواسکولکس* در محتویات شکمبه گوسفند، بز و گاو میش آبی مشاهده نشد (۲۴). Eadie دریافت که استقرار *افریواسکولکس* (*Ophryoscolex*) در بز و گوسفند جوان مشکل است، این گونه به‌طور ناپایدار در نشخوارکنندگان پیر می‌تواند استقرار یابد که مرتبط با آنتاگونیستی *افریواسکولکس* و *دیپلودینیوم* است (۳۵). زمانی که هر دو جنس در شکمبه حضور دارند، *افریواسکولکس* به تدریج حذف می‌شود. Franzolin و Dehority گزارش کردند که با جیره‌های متفاوت، *آنتودینیوم‌ها* پروتوزوآی غالب در شکمبه گاو هستند (۳۶). حضور مؤکدار *آنتودینیوم*، به دلیل وجود سلولاز فعال، هضم اجزای دیواره سلولی در شکمبه را بهبود می‌دهد که به فعالیت سلولیتیک اختصاصی این مؤکداران مربوط می‌شود. Taghizadeh و همکاران گزارش کردند یکی از دلایل غالب بودن گونه‌های *آنتودینیوم* می‌تواند ناشی از مقاومت بالای این گونه‌ها در شرایط مختلف شکمبه‌ای در مقایسه با سایر جنس‌ها باشد (۳۷). تعداد گونه و تراکم پروتوزوآ می‌تواند بین حیوانات یک گونه از نشخوارکنندگان و هم‌چنین بین گونه‌های مختلف، متفاوت باشد. یک عامل مؤثر در این مورد، موقعیت جغرافیایی می‌باشد که احتمالاً انعکاسی از جیره حیوان، منشأ حیوان و ایزوله بودن احتمالی آن از دیگر نشخوارکنندگان است. خصوصیات ویژه پروتوزوآ شکمبه و هم‌چنین تضاد بین گونه‌های پروتوزوآ نیز ممکن است در این تنوع نقش داشته باشد (۳۸). دام به‌وسیله عوامل فیزیولوژیکی ناشناخته‌ای می‌تواند روی جنس و گونه‌های پروتوزوآیی که در شکمبه استقرار پیدا می‌کنند اثر بگذارد. از جمله این 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 اندازه ذرات در شکمبه را نام برد. *آنتودینیوم‌ها* نشاسته، همی سلولز، مالتوز و ساکارز را تخمیر می‌کنند و کوچک‌ترین اندازه را در بین پروتوزوآی شکمبه دارند (۳۸). بیش‌ترین میزان تخمیر سلولز، گلوکز و نشاسته را *دیپلودینیوم‌ها* انجام می‌دهند (۲۴). *هولوتریش‌ها* کربوهیدرات‌های غیرنشاسته‌ای و قندهای محلول را مصرف می‌کنند (۳۹). جمعیت *هولوتریش* در شکمبه تحت تاثیر نوع جیره و ترکیبات جیره مصرفی توسط حیوان می‌زبان می‌باشد، چرا که پس از مصرف خوراک و افزایش گلوکز در شکمبه، جمعیت گونه‌های *هولوتریش‌ها* تحریک شده و فعالیت این گونه از پروتوزوآ افزایش می‌یابد (۴۰). در مطالعه Ganji Jamehshooran و همکاران استفاده از افزودنی‌های باکتریایی و آنزیمی پتانسیل تولید گاز را افزایش داد (۲۹). شاید بتوان بالا بودن پتانسیل کاهش تولید متان در تیمار دارای افزودنی آنزیمی را به بالاتر بودن عامل تفکیک نسبت داد. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، تیمار حاوی آنزیم دارای بالاترین عامل

9. **FAO. 2013.** Food and Agricultural organization of United Nation, Rome, Italy. 51: 209.
10. **Hashemi, A. and Razzaghzade, S., 2007.** Investigation on the possibility of ensiling Cucurbit (Cucurbita Pepo) residues and determination of best silage formula. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6(12): 1450-1452.
11. **Mokhtarpour, Gh. and Abbasi, A., 1994.** Selection of the best silage preparation method of pumpkin and nut residues, final report of the research project, natural resources research center of khuzestan province. 45 p. (In persian)
12. **Cherch, D.C., 1996.** *Livestock feeds and feeding*. 2nd Edition. Princeton Hall. Newjersey.
13. **Vucetic, J., Cirovic, M. and Mati, V. 1989.** Chemical composition, Nutritive value and healing properties of the Pumpkin. *Hrana i Ishrana*. 30(3-4): 159-161.
14. **McDonald, P., Henderson, A.R. and Heron, S.J.E., 1991.** *The biochemistry of silage* (2nded), Chalcombe, U.K. 184 p. <https://doi.org/10.1017/S0014479700023115>.
15. **Filya, I., Muck, R.E. and Contreras-Govea, F.E., 2007.** Inoculant Effects on Alfalfa Silage: Fermentation Products and Nutritive Value. *Journal of Dairy Science*. 90: 5108-5114.
16. **Aksu, T., Baytok, E., Akif Karsli, M. and Muruz, H., 2006.** Effects of formic acid. Molasses and inoculant additives on corn silage composition. organic matter digestibility and microbial protein synthesis in sheep. *Journal of Small Ruminant Research*. 61: 29-33. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.12.01>.
17. **Oude Elferink, S.J., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F. and Driehuis, F., 2001.** Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol*. 67:125-132. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>.
18. **Fatehi, F., 2014.** *Genetics and Livestock Breeding*, Dibagaran Publications, Tehran. 351 p. (In persian)
19. **Kung, J.R., Myers, C.L., nylon, J.M., Taylor, C.C., Mills, J.A. and Whiter, A.G., 2004.** The effects of buffered propionic acid-based additives alone or combined with microbial inoculation on the fermentation of the high moisture corn and whole-crop barley. *J. Dairy Sci*. 87: 1310-1316.
20. **Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. and France, J., 1994.** A simple production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48: 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6).
21. **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 feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agriculture Science*. 93: 217-222. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>.
22. **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: 64-75.
23. **Blummel, M., Steingass, H. and Becker, K., 1997.** The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of

تفکیک بود. قابل ذکر است که عامل تفکیک بالاتر، به معنی مصرف خوراک بیشتر، تولید توده میکروبی بالاتر و تولید متان کم‌تر می‌باشد. از دیگر دلایل احتمالی می‌توان به شرایط تخمیر و محصولات تخمیر تولیدی با توجه به واکنش‌های استیوکیومتری آن‌ها اشاره داشت. شاید در تیمارهای دارای آنزیم یا باکتری + آنزیم، غلظت اسیدهای چرب استیک و بوتیریک بالاتر بوده، تولید این دو اسید چرب، هم‌زمان با تولید دی‌اکسید کربن و هیدروژن همراه می‌باشد و تولید این دو اسید چرب سوبسترای بیش‌تری را برای واکنش‌های تولید متان فراهم می‌کنند (۴۱). نتایج حاصل از تحقیق فوق نشان داد که مخلوط سیلوی بقایای کدوآجیلی و تفاله گوجه‌فرنگی باعث ایجاد سیلوی با کیفیت مطلوب می‌گردد. با وجود این که بین تیمار شاهد و تیمارهای آزمایشی حاوی افزودنی از نظر برخی ترکیبات شیمیایی و فراسنجه‌های تولید گاز اختلاف معنی‌دار وجود داشت، با این حال به نظر می‌رسد که سیلاژ مخلوط تفاله گوجه‌فرنگی و بقایای کدو آجیلی بدون افزودنی و با رعایت اصول مدیریتی تهیه سیلاژ می‌تواند تهیه شود.

## منابع

1. **Paya, H. and Taghizadeh, A., 2018.** Effect of Lasalocid on rumen ecosystem and fermentation parameters in Ghezel sheep. *Journal of Animal Environment*. 10(3): 53-58. (In persian)
2. **Fazaeli, H., 2018.** Optimum use of agricultural residues in livestock feeding. The 4th national conference on the study of waste of agricultural products of Tarbiat Modares University. 204-198. (In persian)
3. **Elloitt, J., Mulvihill, E., Dumcan, C., Forsythe, R. and Kritchevsky, D., 1981.** Effect of tomato pomace and mixed vegetable pomace on serum and liver cholesterol in rats. *Journal Nutrition Animal Science*. 111: 2203-2211.
4. **Bordowski, D.L. and Geisman, J.R., 1980.** Protein content and amino acid composition of protein of seeds from tomatoes at various stages of ripeness. *J. food. sci*. 45: 228-229.
5. **Liadakis, G.N., Tzia, C., Oreopoulou, V. and Thomopoulos, C.D., 1995.** Protein isolation from tomato seed meal extraction optimization. *J. food sci*. 60: 477-482.
6. **Battaglini, M. and Costantini, F., 1978.** Byproducts from the tomato industry in diets for growing rabbits. *Coniglicoltura*. 15 (10): 19-22. <https://www.feedipedia.org/node/7743>.
7. **Heuze, V., Tran, G., Bastianelli, D., Hassoun, P. and Lebas, F., 2013.** Tomato pomace, tomato skins and tomato seeds. *Feedipedia. org*. A programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. 1-11.
8. **Gasa, J., Castrillo, C., Baucells, M.D. and Guada, J.A., 1989.** By-products from the canning industry as feedstuff for ruminants: Digestibility and its prediction from chemical composition and laboratory bioassays. *Anim. Feed Sci. Technol*. 25 (1-2): 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.liv>.



36. **Franzolin, R. and B.A. Dehority., 2010.** The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39: 2262-2267.
37. **Taghizadeh, A., Alizadeh, S. and Nobakht, A., 2010.** Survey the effect of lasalocid ruminal characteristics, blood parameters and performance of Ghezel lambs. *Journal of Animal Science Researches*. 4(1).
38. **Hobson, P.N. and Stewart, C.S., 1997.** The rumen microbial ecosystem, Elsevier Science Publishers Ltd, London and New York.
39. **Van Soest, P.G., 1994.** *Nutritional Ecology of Ruminants*. 2nd edn. Cornell University Press. 476 p.
40. **Henderson, G., Stewart, C.S. and Nekrep, F.V., 1981.** The effect of monensin on pure mixed cultures of rumen bacteria. *The Journal of applied bacteriology*. 51: 159-169.
41. **Morgavi, D., Forano, E., Martin, C., Newbold, C., 2010.** Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminant. *Animal*. 4: 1024-1036.
24. **Dehority, B.A., 2003.** *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 372 p.
25. **Fievez, V., Babayemi, O.J. and Demeyer, D., 2005.** Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acids production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124: 197-210.
26. **Valizadeh, R., Naserian, A. and Azhdari Fard, A., 2003.** Biochemistry of silage (translation). Publications of Ferdowsi University of Mashhad. 12-15. (In persian)
27. **Muck, R.E., 2010.** Silage additives and management issues. Proceedings of Idaho Alfalfa Forage Conference, Best Western Burley, Idaho, USA. 16-17 February 2010, 49-55.
28. **Eun, J.S. and Beauchemin, K.A., 2007.** Relationship between enzymic activity and *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 53-67. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-820>.
29. **Ganji Jamehshooran, E., Jafari Khorshidi, K. and Bayat Kouhsar, J., 2022.** Chemical composition, aerobic stability and fermentation pattern of tomato pomace and pumpkin waste silage using fibrolytic enzymes and lactic acid bacteria. *International journal of recycling organic waste in agriculture*. 11(1): 47-59. <https://doi.org/10.30486/IJROWA.2021.1923435.1203>.
30. **Dehghani, M.R., Weisbjerg, M.R., Hvelplund, T. and Kristensen, N.B., 2012.** Effect of enzyme addition to forage at ensiling on silage chemical composition and NDF degradation characteristics. *Livest. Sci.* 150 :51-58. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.07.031>.
31. **Olivera, R.M.P., 1998.** Use of *in vitro* gas production technique to assess the contribution of both soluble and insoluble fraction on the nutritive value of forages. A thesis to the University of Aberdeen, Scotland, in partial fulfillment of the degree of Master of Science in animal nutrition.
32. **Bayat Kohsar, J., Maqsoodlou, F., Azarnia, M., Ghanbari, F. and Rezaei, F., 2021.** Effects of seed priming with some plant growth regulators and fertilization with organic manure on the chemical composition, *in vitro* gas production parameters and digestibility of lentils. *Journal of Animal Environment*. 1: 93-102. <https://doi.org/10.22034/aej.2020.132890>. (In persian)
33. **Keshavarz Gulper, Z., Bayat Kohsar, J., Ghanbari, F. and Taliei, F., 2020.** Effect of using organic acid and alcoholic extract of propolis on chemical composition, aerobic stability, microbial population and gas production parameters of barley silage in ruminant nutrition. *Journal of Animal Environment*. 4: 111-122. <https://doi.org/10.22034/AEJ.2020.124977>. (In persian)
34. **Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A. and Beauchemin, K.A., 2008.** A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. 145: 209-228.
35. **Eadie, J.M., 1967.** Studies on the ecology of certain rumen ciliate protozoa. *J. Gen. Microbiol.* 49: 175-194.