مقاله پژوهشی

تاثیر 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[1]، کاوه جعفری‌خورشیدی[1]، جواد بیات کوهسار[2]*

[1] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

[2] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

کلمات کلیدی

سیلاژ تفاله گوجه فرنگی

سیلاژ بقایای کدو آجیلی

آنزیم

باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک

تخمیر

چکیده

مقدمه: این پژوهش به‌منظور بررسی تاثیر 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 ٤) شاهد+آنزیم+افزودنی باکتریایی، بودند. تیمارهای آزمایشی در سه تکرار در کیسه‌های نایلونی به وزن ۳ کیلوگرم به‌صورت دستی فشرده و به‌مدت 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<۰/۰۳۵) 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>۰/۰۵). بازده تولید پروتئین میکروبی اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵). از نظر جمعیت پروتوزوآ بین تیمارهای آزمایشی جمعیت کل و هالوتریش‌ها اختلاف آماری‌معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). ولی در جمعیت آنتودینیوم، دیپلودینیوم، ایزوتریکس، اختلاف آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵).از نظر تولید متان در فاکتور کل گاز تولیدی و پتانسیل کاهش تولید متان اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). ولی از نظر متان اختلاف آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طورکلی، 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.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: kaveh.khorshidi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۲ فروردین ۱٤۰۱؛ تاریخ داوری: ۱۵ اردیبهشت ۱٤۰۱؛ تاریخ اصلاح: ۱۹ تیر ۱٤۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۲۷ مرداد ۱٤۰۱

(DOI): 10.22034/AEJ.2022.353567.2854

مقدمه

در سالیان اخیر، صنایع لبنی و پروتئینی به‌دلیل افزایش جمعیت، بالارفتن 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 به‌عنوان محصولات فرعی در تغذیه دام اهمیت زیادی پیدا کرده و دارای چندین مزیت مهم می‌باشد: اول این‌که 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 به‌دلیل 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 گوجه‌فرنگی به‌عنوان یک منبع خوب الیاف، ویتامین B، لیکوپن، پروتئین و چربی در تغذیه نشخوارکنندگان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد که فاقد فاکتورهای ضدتغذیه‌ای 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 گوجه‌فرنگی دارای چربی قابل ملاحظه‌ای (۱۵-۱۰ درصد ماده خشک) بوده که بیش‌تر آن به‌صورت 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 لیپازها و مواد سمی می‌باشد. مقادیر الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی آن به‌ترتیب در دامنه ۷۲-۵۰ و ۶۰-۳۹ 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 گوجه‌فرنگی 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 کدوی آجیلی بالاست (۱۰). سطح زیر کشت کدوی 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 آن‌که می‌تواند به‌عنوان غذای انسان مصرف شود می‌تواند به‌عنوان 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 کارتینوئیدها می‌باشد (۱۳). کدو علاوه بر آن‌که می‌تواند به‌عنوان غذای انسان مصرف شود می‌تواند به‌عنوان خوراک دام نیز مورد استفاده قرار گیرد (۱۰). به‌دلیل بالابودن مواد مغذی مختلف و رطوبت بالا (۹۰-۸۸۶درصد) و تولید در ماه‌های گرم سال هر دو محصول به‌سرعت آلوده به کپک می‌شوند و شرایط مناسبی را برای رشد و ازدیاد حشرات عوامل بیماری‌زا فراهم می‌کنند. به‌همین دلیل مصرف آن به‌شکل تازه بیش‌تر از یک شبانه روز میسر نبوده و باید سریع مصرف گردند. لذا روش سیلو کردن برای نگه‌داری آن‌ها عملی‌تر می‌باشد. نگه‌داری علوفه به‌صورت 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). باتوجه به ویژگی‌های بقایای کدو آجیلی به‌خاطر مقادیر بالای کربوهیدرات محلول و تفاله گوجه فرنگی به‌خاطر میزان بالای پروتئین خام ترکیب این دو در تهیه سیلاژ از روند تخمیر در سیلو به‌شکل بهتری حمایت می‌کند. افزودنی‌های بسیاری برای استفاده در سیلاژ به‌منظور 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 سیلوکردن 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 به‌وسیله این آنزیم‌ها تجزیه نمی‌شوند، از این‌رو احتمالاً برخی مواد مغذی غیرقابل دسترس

می‌باشند. ساختمان شیمیایی سلول‌های گیاهی، زمان محدود در دسترس برای فعالیت در بخش‌هایی خاص از دستگاه گوارش و وجود ترکیبات ضد تغذیه‌ای در برخی خوراک‌ها 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 ناخالص‌بودن مواد بوده‌است. در نتیجه پیشرفت‌های به‌دست آمده در زیست فناوری، اکنون تولید انبوه و نسبتاً کم‌هزینه 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 الیاف 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 گوجه‌فرنگی موردنیاز از کارخانه رب گوجه‌فرنگی دلند 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 به‌مدت چند ساعت در آزمایشگاه پژمرده شدند. جهت تهیه سیلوهای آزمایشگاهی، ابتدا بقایای کدو آجیلی و تفاله گوجه‌فرنگی 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 گوجه‌فرنگی به نسبت ۱:۱ (به‌عنوان شاهد)، ۲) شاهد+آنزیم (به‌مقدار ۳ گرم در کیلوگرم)، ۳) شاهد+افزودنی باکتریایی تولید شده در آزمایشگاه (8×10^{10} 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 به‌مدت ۹۰ روز به شکل کاملاً بسته و در دمای 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 پلانتاروم* 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 براث (Merck, KGaA Germany) بعد از کشت لوله‌ها به‌مدت 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 به‌مدت 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 ۰/۵گرم از هر نمونه داخل هر یک از ظروف شیشه‌ای ریخته و سپس ۵۰ سی‌سی از مخلوط بزاق مصنوعی و مایع شکمبه به‌نسبت ۲ به ۱ (۲ حجم بزاق مصنوعی و ۱ حجم مایع شکمبه) به‌داخل هر ظرف شیشه‌ای افزوده شد (۲۱). در ادامه به‌داخل هر کدام از ظروف شیشه‌ای به‌مدت ۱۰ ثانیه گاز co_2 تزریق کرده و درب آن توسط درب لاستیکی و درپوش آلومینیمی 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. درنهایت 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 به‌مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند تا این‌که وزن خشک نمونه‌های حذف شده مشخص گردد. درنهایت کروزه‌های حاوی باقی‌مانده مواد گوارش نشده، به‌مدت ۶ ساعت در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. این عمل برای به‌دست آوردن مقدار

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

MB= (میلی‌گرم) GP × (PF – ۲/۲)

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 پروتوزوآ: برای شمارش پروتوزوآ 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 پروتوزوآ به‌وسیله 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 هیدروکسیدسدیم ۱۰ نرمال با کمک سرنگ به‌داخل 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:

CH_4= گاز متان ۲۴ ساعت/ ۱۰۰× گاز متان ۲۴ ساعته

MRP= (میانگین شاهد – (CH_4)/ میانگین شاهد × ۱۰۰)

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، μ: میانگین هر صفت در جمعیت کل، e_{ij}: اثر خطای آزمایش

نتایج

تاثیر 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 داده‌شده است.استفاده از افزودنی‌های باکتریایی و آنزیمی تاثیر 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). تاثیر استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی بر جمعیت پروتوزوآی سیلاژ مخلوط تفاله گوجه فرنگی و تفاله کدو در جدول ۲ نشان داده شده است. استفاده از افزودنی‌های باکتریایی و آنزیمی بر جمعیت کل پروتوزوآ و *هالوتریش‌ها* موثر بود (P<۰/۰۵)، ولی بر جمعیت *آنتودنیوم‌ها*، *دیپلودینیوم* و *افریواسکولکس* تاثیر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). تاثیر 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).

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 (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	تولید توده میکروبی (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)	بازده تولید پروتئین میکروبی	تولید گاز (میلی‌لیتر در گرم ماده خشک)	pH	ازت آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)
شاهد	۴۵/۸۰	۴۷/۸۹	۴/۳۸^{b}	۱۱۰/۶۰	۰/۴۹^{b}	۲۲۴/۷۷	۶/۶۴^{a}	۰/۵۸^{a}
باکتری	۵۵/۱۰	۵۱/۱۲	۴/۵۷^{ab}	۱۱۹/۷۸	۰/۵۱^{ab}	۲۰۴/۲۶	۴/۴۳^{bc}	۰/۳۰^{c}
آنزیم	۴۷/۹۰	۴۹/۶۹	۴/۷۴^{a}	۱۲۰/۳۵	۰/۵۴^{a}	۲۱۰/۳۹	۶/۵۶^{ab}	۰/۵۲^{b}
باکتری+آنزیم	۴۹/۱۰	۵۱/۹۷	۴/۴۹^{ab}	۱۱۷/۸۰	۰/۵۱^{ab}	۲۱۸/۰۵	۶/۳۹^{c}	۰/۲۲^{d}
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<۰/۰۵).

جدول ۲: تاثیر استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی بر جمعیت پروتوزوآ (10^5x میلی‌لیتر)

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

SEM: میانگین خطای استاندارد P-value: سطح احتمال معنی‌داری. میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵)

جدول۳: 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^{a}	۲۸/۴۱	۰
باکتری	۱۰۸/۴۳^{b}	۳۰/۴۳	۲/۷۱^{b}
آنزیم	۱۱۰/۲۳^{ab}	۲۷/۰۳	۱۸/۷۴^{a}
باکتری+آنزیم	۱۱۴/۱۶^{ab}	۲۸/۷۱	۱۰/۸۷^{ab}
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 به‌کمک فرآیند طبیعی تخمیر و از طریق تولید اسید لاکتیک به‌دست 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 قراردادن بیش‌تر کربوهیدرات‌های محلول برای باکتری‌های سیلو در تهیه سیلاژ با کیفیت و ماندگاری بالا کمک می‌کنند (۲۷، ۲۸). 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 پروتئین‌خام 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). به‌نظر می‌رسد که استفاده از افزودنی باکتریایی و آنزیمی در مقایسه با شاهد، مواد مغذی بیش‌تری را در سیلو حفظ کرده باشد. با این‌حال، عدم معنی‌داری را شاید نتوان به عدم تاثیر افزودنی‌ها در سیلو نسبت داد، چراکه 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 تلقیح آنزیم‌های فیبرولایتیک و باکتری‌های اسیدلاکتیک در شرایط آزمایشگاهی قابلیت هضم سیلو را بهبود نبخشیدند (۳۰). بالاترین مقدار عامل تفکیک، تولید پروتئین میکروبی و بازده تولید پروتئین میکروبی مربوط به تیمار دارای افزودنی آنزیمی بود (به‌ترتیب ۴/۷۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۲۰/۳۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک، ۰/۵۴ واحد). با این‌حال بین تیمارهای دارای افزودنی اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (P>۰/۰۵). 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 Kohsar و همکاران تیمارهای پرایمینگ شده با اسیدسالیسیلیک و تلقیح شده دارای بالاترین عامل تفکیک بودند (۳۲). درتضاد با نتایج حاصل از این تحقیق در مطالعه کشاورز و همکاران سیلاژ قصیل 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 نیتروژن 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* کالاً صفر و *دیپلودینیوم* معنی‌دار نبود. با این‌حال جمعیت کل و *هالوتریش‌ها* بین تیمارها 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 گاومیش آبی مشاهده نشد (۲۴). Eadie دریافت که استقرار *افریواسکولکس* (*Ophryoscolex*) در بز و گوسفند جوان مشکل است، این‌گونه 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* به‌تدریج حذف می‌شود. Franzolin و Dehority گزارش کردند که با جیره‌های متفاوت، *آنتودینیوم‌ها* پروتوزوآی غالب در شکمبه گاو هستند (۳۶). حضور مژکدار *آنتودینیوم*، به‌دلیل وجود سلولاز فعال، هضم اجزای دیواره سلولی در شکمبه را بهبود می‌دهد که به فعالیت سلولیتیک اختصاصی این مژکداران 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 تأثیر قرار دهد)، سرعت تخمیر، فشار اسمزی و اندازه ذرات در شکمبه را نام برد. *آنتودینیوم‌ها* نشاسته، همی‌سلولز، 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 تأثیر 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. همان‌طورکه در جدول ۱ مشاهده می‌شود، تیمار حاوی آنزیم دارای بالاترین عامل

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 باتوجه به‌واکنش‌های استیوکیومتری آن‌ها اشاره‌داشت. شاید در تیمارهای دارای آنزیم یا باکتری+ آنزیم، غلظت اسیدهای چرب استیک و بوتیریک بالاتر بوده، تولید این دو اسیدچرب، هم‌زمان با تولید دی‌اکسیدکربن و هیدروژن همراه می‌باشدو تولید این‌دو 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 این‌که بین تیمار شاهد و تیمارهای آزمایشی حاوی افزودنی از نظر برخی ترکیبات شیمیایی و فراسنجه‌های تولید گاز اختلاف معنی‌دار وجود داشت، با این‌حال به‌نظر 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 Sciense. 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. **Liadakid, 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.
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 Cucurit (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 Eedition. 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/10.10 16/0377-8401(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/S0021859600 086305.
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 biomas yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of

roughages. British Journal of Nutrition. 77: 911- 921.

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 Beauchemine, K.A., 2007.** Relationship between enzymic activitiz and *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silag. 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 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.

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 Sience Publishers Ltd, London and New York.

39. **Van Soest, P.G., 1994.** Nutritional Ecology of Ruminants. 2nd edn. Cornelluniversity 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 ruminanst. Animal. 4: 1024-1036.