

## تاثیر تخمیرپذیری جیره بر جمعیت پروتوزوایی شکمبه در بره‌های پرواری

علی حسین خانی<sup>۱</sup>، مهدی مرادی<sup>۲</sup> و غلامرضا حمیدیان<sup>۳</sup>

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسؤول: a.hosseinkhani@tabrizu.ac.ir)

۲- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۱

صفحه: ۳۷ تا ۴۵

### چکیده

این تحقیق به منظور بررسی و ارزیابی استفاده از پسماندهای غذایی رستوران بر جمعیت پروتوزوایی شکمبه در بره‌های پرواری طی ساعات مختلف خوراک‌دهی انجام شد. ۱۵ راس بره نر دوزگ قزل-آرخار مرینو با استفاده از جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. جیره‌های آزمایشی شامل سطوح مختلف دانه جو و پسماند رستوران بودند. پسماند رستوران در دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ درصد جایگزین دانه جو در جیره گردید. مایع شکمبه با استفاده از سوند معدی در زمان‌های قبل، ۲ و ۴ ساعت بعد از خوراک‌دهی جهت تعیین pH، تولید اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی و شمارش جمعیت پروتوزوا گرفته شد. تخمیرپذیری جیره نیز با استفاده از روش تولید گاز اندازه‌گیری شد. نتایج تحقیق نشان داد میزان تخمیرپذیری دانه جو در طول ۴۸ ساعت انکوباسیون حدود ۱۶٪ بیشتر از پسماند رستوران بود (۳۴۱ در مقابل ۲۹۴ میلی‌لیتر در گرم ماده خشک) و ثابت تجزیه بالاتری نیز داشت (۰/۱۰۷ در مقابل ۰/۰۹۹) ( $p < 0/05$ ). جیره‌های حاوی پسماند رستوران pH و نسبت مولی بالاتری از اسیدهای چرب در مقایسه با جیره‌های حاوی دانه جو داشتند ( $p < 0/05$ ). جمعیت پروتوزوایی شکمبه در زمان قبل از تغذیه در جیره‌های بر اساس جو کمترین و جیره بر اساس پسماند بالاترین بود (۶۹/۴ در مقابل ۷۹/۵  $\times 10^4$ ) ( $p < 0/05$ ). در زمان ۲ ساعت پس از تغذیه تفاوتی بین تیمارهای آزمایشی از نظر تعداد پروتوزوا وجود نداشت اما ۴ ساعت پس از تغذیه شرایط کاملاً برعکس شد و جیره‌های بر اساس جو بالاترین و پسماند رستوران کمترین تعداد پروتوزوا را دارا بودند (۷۸/۵ در مقابل ۵۶  $\times 10^4$ ) ( $p < 0/05$ ). به نظر می‌رسد محتوای چربی بالاتر پسماند رستوران و pH پایین شکمبه در این جیره‌ها به‌عنوان عوامل اصلی در کاهش جمعیت پروتوزوایی نقش داشته‌اند لذا در استفاده از آن به‌ویژه در سطوح بالای جیره در نشخوارکنندگان بایستی احتیاط لازم را بعمل آورد.

واژه‌های کلیدی: پسماند رستوران، دانه جو، بره پرواری، شمارش پروتوزوا، تکنیک تولید گاز، اسیدهای چرب فرار، اسیدیته شکمبه

### مقدمه

شکمبه اکوسیستم پیچیده‌ای متشکل از میکروارگانیسم‌های مختلفی از جمله باکتری، قارچ و پروتوزواها می‌باشد. نشان داده شده است که پروتوزوا می‌تواند تا ۵۰ درصد وزنی میکروارگانیسم‌های شکمبه را تشکیل داده و نقش مهمی در هضم، تثبیت pH، شکستن پروتئین‌های غذا و سلول‌های باکتری ایفا نماید (۲). این میکروارگانیسم‌ها همچنین بر بازدهی مصرف انرژی ناشی از تجزیه مواد در شکمبه موثر می‌باشند (۲۳). در تحقیقات متعددی وجود ارتباط بین تخمیر و جمعیت پروتوزوایی شکمبه نشان داده شده است (۶). پروتوزواها برای ادامه حیات به مواد خوراکی وابسته بوده اما از باکتری‌ها نیز تغذیه می‌کنند. پروتوزوا به‌دلیل بلعیدن سریع گرانول‌های نشاسته اثرات بافوری دارند که سرعت تخمیر توسط باکتری‌های شکمبه و بدنبال آن تولید اسیدهای آلی (اسیدهای چرب فرار) را کاهش می‌دهد. این اثرات بافوری منجر به ثبات تخمیر در شکمبه شده و پتانسیل احیا در مواد هضمی شکمبه را کاهش می‌دهد (۱۱). حیوانات فاقد پروتوزوای شکمبه با در نظر گرفتن کیفیت خوراک مصرفی، اغلب افزایش در تعداد باکتری‌های شکمبه، کاهش در تولید آمونیاک و اسیدهای چرب فرار و کاهش در قابلیت هضم ماده آلی نشان می‌دهند (۵).

جمعیت پروتوزوای شکمبه تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب شیمیایی جیره، نرخ عبور مواد هضمی از دستگاه

گوارش، سطح مصرف خوراک، سن و pH شکمبه می‌باشد. با افزایش سطح کنسانتره در جیره تعداد پروتوزوا و عمدتاً نوع انتودینیوم<sup>۱</sup> کاهش می‌یابد. جمعیت بالای پروتوزوا در شکمبه معمولاً توام با کاهش عملکرد تولیدی دام می‌باشد. برخی محققین نشان دادند که استفاده از روغن و چربی در جیره نشخوارکنندگان تعداد پروتوزوای شکمبه را کاهش می‌دهد (۲۰، ۸).

روش‌های مولکولی بر اساس آنالیز و انگشت‌نگاری DNA به‌عنوان یک جایگزین نسبی برای طبقه‌بندی کلاسیک پروتوزوا معرفی شده‌است. در سالیان اخیر، تکثیر قطعات<sup>۲</sup> و تعیین توالی ژن‌های زیر واحدهای کوچک RNA ریبوزومی<sup>۳</sup> حاصل از باکتری‌ها و قارچ‌های شکمبه‌ای انقلابی در مطالعات اکولوژی شکمبه بوجود آورده‌است، هرچند که تعداد کمی از مطالعات این دستاورد را در بررسی پروتوزوای شکمبه بکار برده‌است که عمدتاً بدلیل احتیاجات غذایی ویژه برای رشد پروتوزوای شکمبه بوده‌است (۲۲).

پسماند رستوران می‌تواند به‌عنوان منبعی مناسب و ارزان قیمت جایگزین مناسبی برای برخی از مواد خوراکی در جیره حیوانات اهلی باشد (۲۸). با توجه به ماهیت پسماند رستوران در ایران و در نظر گرفتن این نکته که بخش اعظم پسماند رستوران را برنج پخته شده شامل می‌شود لذا می‌تواند الگوی تخمیر در شکمبه را به هنگام جایگزینی با غلاتی نظیر جو متاثر سازد. از طرف دیگر این خوراک، مقادیر بالایی چربی

دمای ۶۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت، در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ماده خشک، پروتئین خام، خاکستر و عصاره اتری با روش (AOAC) و NDF با روش ون سوست و همکاران (۲۸) تعیین شد. ترکیبات شیمیایی پسماند رستوران شامل ماده خشک، پروتئین خام، چربی و خاکستر به ترتیب ۳۳/۴، ۱۵/۱، ۱۴ و ۴ درصد تعیین گردید (۱۶).

کل دوره آزمایش ۱۱۰ روز شامل ۱۴ روز دوره عادت‌دهی و ۸۶ روز دوره آزمایش بود که در طی آن، عادت‌پذیری حیوان به محیط جدید و حد اختیاری مصرف خوراک توسط بره‌ها تعیین شد. جیره‌ها به صورت کاملاً مخلوط<sup>۲</sup> و در ۳ وعده در ساعات ۸، ۱۳ و ۱۸ در اختیار بره‌ها قرار می‌گرفت و مقدار خوراک مصرفی به گونه‌ای تنظیم گردید که حدود ۱۰-۵ درصد خوراک در هر وعده باقی بماند. بره‌ها در طول آزمایش بطور آزاد به سنگ نمک و آب دسترسی داشتند. پسماند رستوران بصورت روزانه و تازه از سلف سرویس مرکزی دانشگاه تبریز تهیه می‌شد. با توجه به رطوبت بالای پسماند، برای اینکه مخلوط همگنی از نظر بافت فیزیکی خوراک حاصل شود ابتدا آنرا با کاه مخلوط کرده و سپس جیره بصورت کاملاً مخلوط تهیه می‌شد. نمونه‌برداری از شکمبه با استفاده از لوله معدی و در زمان‌های صفر (قبل از تغذیه)، ۲ و ۴ ساعت پس از تغذیه در هفته آخر دوره پروار انجام شد. با توجه به اینکه استفاده از لوله مری منجر به تنش در حیوان و بدنبال آن کاهش یا عدم مصرف خوراک در ساعت‌های بعد می‌شد لذا نمونه‌گیری مایع شکمبه در ساعت‌های مذکور طی سه روز مختلف با فاصله دو روزه انجام شد. مایع شکمبه پس از صاف شدن، در محلول تثبیت کننده فرمالدئید به نسبت ۱ به ۴ قرار گرفت و برای شمارش تعداد پروتوزوا به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه ساعت ۴ علاوه بر تشخیص جمعیت پروتوزوایی برای تعیین pH، کل اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی نیز مورد استفاده قرار گرفت. pH مایع شکمبه با استفاده از pH متر تعیین شده، نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه با استفاده از روش برودریک و کنگ (۱) و اندازه‌گیری کل اسیدهای چرب فرار با استفاده از روش مارخام (۱۲) و در دو مرحله تقطیر و تیتراسیون انجام شد.

دارد که می‌تواند جمعیت میکروبی و پروتوزوایی شکمبه را تحت تاثیر قرار دهد. بنظر می‌رسد تا بحال تحقیقی در زمینه تاثیر استفاده از پسماند رستوران یا خوراک‌هایی با شرایط مشابه آن بر جمعیت پروتوزوایی شکمبه با توجه به ماهیت مواد مغذی موجود در آن و فراوری‌هایی که در حین تهیه غذای انسان روی اقلام غذایی اعمال می‌شود، انجام نشده است. بنابراین هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر استفاده از سطوح مختلف پسماندهای رستوران به‌عنوان جایگزین جو در جیره بره‌های پرواری بر جمعیت پروتوزای شکمبه بود.

### مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در قالب ۲ آزمایش مجزا انجام شد. در آزمایش نخست اثرات جیره‌های با تخمیرپذیری مختلف بر جمعیت گونه‌های مختلف پروتوزوا بررسی شد. به‌علاوه تاثیر جیره‌های آزمایشی بر رفتار تغییر جمعیتی پروتوزوا در زمان‌های مختلف تغذیه یعنی زمان صفر یا قبل از شروع خوراک دادن، ۲ و ۴ ساعت پس از خوراک دادن مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش دوم روش مرسوم شمارش مستقیم جمعیت پروتوزوا با روش مولکولی<sup>۱</sup> مورد مقایسه و اعتبار سنجی قرار گرفت.

حیوانات آزمایشی: ۱۵ راس بره هبیرید نر (قلز × مرینو، مرینو × مغانی) با وزن متوسط  $37.7 \pm 0.5$  کیلوگرم و سن ۷ ماه انتخاب و به صورت تصادفی در سه گروه داخل قفس‌های انفرادی قرار گرفتند. دوره‌های ۱۵ روزه برای عادت‌دهی حیوانات به جیره‌های غذایی در نظر گرفته شد. جیره‌های مورد آزمایش شامل ۳ گروه شاهد (تمامی غلات جیره از منبع جو)، تیمار دوم (جایگزینی ۵۰ درصد از دانه جو با پسماند رستوران) و تیمار سوم (جایگزینی تمامی جو با پسماند رستوران) بوده و با استفاده از NRC (1985) برای بره‌ها فرموله شدند (۱۹) (جدول ۱).

پسماند رستوران از سلف سرویس مرکزی دانشگاه تبریز تهیه شد. به منظور انجام تجزیه تقریبی و تعیین میزان مواد مغذی، نمونه گیری به مدت ۴ هفته و بر اساس برنامه رستوران انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به‌صورت روزانه به نسبت مقادیر پسماند باقیمانده روز مربوطه با هم مخلوط می‌شدند. نمونه‌های حاصل پس از خشک کردن در آون با

جدول ۱- ترکیب جیره و آنالیز شیمیایی سطوح مختلف استفاده از پسماند رستوران درجیره بره‌های پرواری (درصد ماده خشک)  
Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (dry matter %)

تیمارهای آزمایشی			
۱۰۰	۵۰	شاهد	
۱۵	۱۵	۱۵	یونجه
۱۵	۱۵	۱۵	کاه گندم
۷	۷	۷	دانه سورگوم
۰	۱۹	۳۸	دانه جو
۳۸	۱۹	۰	پسماند رستوران
۱۸	۱۸	۱۸	سبوس گندم
۵	۵	۵	تقاله چغندر قند
۱	۱	۱	ملاس چغندر قند
۰/۵	۰/۵	۰/۵	مکمل مواد معدنی و ویتامینی
۰/۵	۰/۵	۰/۵	نمک
			ترکیب شیمیایی (درصد)
۸۱/۸±۲/۶	۸۴/۱±۲/۲	۸۹/۱±۱/۸	ماده خشک (DM)
۱۲/۷±۳/۲	۱۲/۳±۳/۰	۱۱/۹±۲/۲	پروتئین خام (CP)
۶/۷±۳/۶	۴/۳±۲/۱	۲/۱±۰/۸	عصاره اتری (EE)
۳۵/۵±۴/۴	۳۷/۶±۲/۳	۳۸/۵±۲/۵	دیواره سلولی (NDF)
۱۹/۴±۲/۹	۱۹/۴±۲/۲	۱۹/۵±۱/۷	دیواره سلولی بدون همی سلولز (ADF)
۲/۷±۱/۳	۲/۷±۰/۸	۲/۶±۰/۳	انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک)

۱- با روش تولید گاز پیشنهادی توسط مینک و استینگاس (۱۴) تخمین زده شده است.  
- تیمار شاهد، فاقد پسماند رستوران، تیمار ۵۰: جایگزینی ۵۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران، تیمار ۱۰۰: جایگزینی ۱۰۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران

#### تعیین کمی پروتوزوا

الف- شمارش مستقیم (میکروسکوپی): جمعیت گونه‌ای پروتوزوا با استفاده از میکروسکوپ المپوس مدل BX-60 (Olympus Corporation, Japan) (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر) و با کمک لام نئوبار در ۵ تکرار از هر نمونه شمارش و چنانچه ضریب تغییرات از ۱۰ درصد بیشتر بود شمارش تکرار گردید (۸). جهت شمارش دقیق از اتوزین و همتاکسین محلول برای رنگ‌آمیزی استفاده شد (شکل‌های ۱ و ۲). به منظور تهیه تصاویر (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر) دوربین دیجیتالی المپوس مدل DP12 (Olympus Corporation, Japan) به‌عنوان دوربین متصل به میکروسکوپ استفاده گردید.



شکل ۲- میکروگراف جنس انتودینیوم  
رنگ آمیزی اتوزین، بزرگنمایی ۱۰۰۰  
Figure 2. *Entodinium* spp. Micrograph  
Eosin staining, ×1000

#### اندازه‌گیری تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی

اندازه‌گیری تولید گاز به روش فدوراک و هاردی انجام گرفت (۴). در این روش جابجایی مایع درون شیشه‌های مدرج توسط فشار گاز تولیدی در شیشه‌های حاوی مایع شکمبه و نمونه خوراک، معرف میزان تولید گاز در نظر گرفته می‌شود. مایع شکمبه مورد نیاز از دو رأس گوسفند فیستولاگذاری شده که به مدت دو هفته با جیره‌ای شامل ۶۰ درصد مواد متراکم و ۴۰ درصد یونجه مرغوب تغذیه شده‌بودند، تهیه گردید. برای تصحیح میزان گاز تولیدی ناشی از مایع شکمبه، سه عدد شیشه به‌عنوان بلانک که فقط حاوی مایع شکمبه بودند در نظر گرفته شد.



شکل ۱- میکروگراف جنس دیپلودینیوم،  
رنگ آمیزی همتاکسین، بزرگنمایی ۱۰۰۰  
Figure 1. *Diplodinium* spp. Micrograph  
Hematoxylin staining, ×1000

RT-PCR به‌وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ SYBR Green با استفاده از دستگاه Applied Biosystems مدل 7300 انجام شد. توالی آغازگرهای پیش رونده و معکوس به ترتیب به شرح جدول ۲ است:

ب- روش مولکولی: مایع شکمبه پس از صاف شدن با پارچه متقال ۴ لایه، سریعاً در دمای  $-20^{\circ}\text{C}$  فریز شد. mRNA پروتوزوا استخراج شده سپس از نظر کمی و کیفی مورد سنجش قرار گرفت. تعیین کمی و شمارش میکروارگانسیم‌های شکمبه بصورت مطلق در Real time

جدول ۲- توالی آغازگرهای پیش رونده و معکوس برای شناسایی جمعیت پروتوزوایی شکمبه

Table 2. Forward and reverse sequences of primer for ruminal protozoa population assay

ژن	آغازگر
هدف	رفت
هدف	برگشت
مرجع	رفت
مرجع	برگشت

تیمارها با آزمون توکی صورت گرفت. مدل آماری این آزمایش به شرح ذیل بود  $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$  که در آن  $\mu$  بعنوان میانگین،  $T_i$  اثر تیمار آزمایشی و  $e_{ij}$  خطای آزمایش بود.

### نتایج و بحث

#### جمعیت گونه‌های مختلف پروتوزوا

بر اساس نمونه‌های اخذ شده از شکمبه در زمان قبل از تغذیه، استفاده از پسماند رستوران بعنوان جایگزین دانه جو در جیره بره‌های پرواری منجر به افزایش معنی‌دار در جمعیت کل پروتوزوای شکمبه گردید ( $79/53$  در مقابل  $69/39 \times 10^4$  در هر میلی‌لیتر، به ترتیب برای جیره‌های بر پایه جو و پسماند رستوران) ( $p < 0.05$ ). از نظر تعداد پروتوزوای هولوتیش، جیره‌های حاوی جو و جو + پسماند رستوران تفاوتی نشان ندادند اما جایگزینی کامل جو با پسماند رستوران منجر به کاهش معنی‌داری در جمعیت این جنس گردید ( $p < 0.05$ ) (جدول ۳). جنس غالب پروتوزوا در شکمبه معمولاً جنس انتودینیوم می‌باشد که جایگزینی کامل جو با پسماند رستوران توانم با بیشترین تعداد این تک یاخته بود ( $p < 0.05$ ).

توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش از مقاله دیمین و همکاران (۳) اخذ گردید. تعیین کمیت نسبی بیان ژن با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به‌طور خلاصه، آستانه چرخه PCR بعنوان تعداد چرخه که در آن افزایش معنی‌دار آماری در فلورسانس سبز SYBR در برابر رنگ منفعل داخلی، ( $ROX$  (  $R_n$ ))، که برای اولین بار تشخیص داده شد تعریف شده است. تعداد کپی از ارزش ژن هدف و CT معکوس مرتبط بود. بنابراین، یک نمونه حاوی تعداد بیشتری از نسخه از ژن هدف، میزان Ct کمتر از یک نمونه با تعداد کمتر از نسخه از همان هدف بود. تفاوت در مقادیر CT ژن‌های داخلی به نام Ct، برای نرمال کردن تفاوت در مقدار RNA کل اضافه شده به مخلوط واکنش cDNA و کارایی واکنش نسخه‌برداری معکوس محاسبه شد. ارزش Ct در نمونه تحت آزمایش از ارزش Ct نمونه شاهد کم شد. تفاوت بعنوان ارزش Ct بیان شد که امکان اندازه‌گیری تغییر در بیان ژن در نمونه را فراهم می‌آورد. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS (۲۴) و رویه MIXED تجزیه و تحلیل شدند و مقایسات میانگین بین

جدول ۳- تاثیر جیره‌های آزمایشی بر جمعیت پروتوزوا در زمان‌های قبل و بعد از تغذیه ( $10^4 \times$  در هر میلی‌لیتر)Table 3. Effect of experimental rations on protozoa counts before and after feed delivery ( $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ )

جنس	زمان	شاهد	۵۰	۱۰۰	SEM <sup>۱</sup>
هولو تریش <sup>۱</sup>	صفر	۱/۹۴ <sup>a</sup>	۱/۷۳ <sup>a</sup>	۱/۵۷ <sup>b</sup>	۰/۱۰۰
	۲	۴/۰۳ <sup>a</sup>	۳/۶۰ <sup>a</sup>	۱/۱۹ <sup>b</sup>	۰/۱۸۰
	۴	۳/۴۳ <sup>a</sup>	۲/۷۰ <sup>a</sup>	۰/۷۸ <sup>b</sup>	۰/۲۵۰
دیپلودینیوم <sup>۲</sup>	صفر	۰/۷۴ <sup>a</sup>	۰/۷۲ <sup>a</sup>	۰/۶۶ <sup>b</sup>	۰/۰۲۰
	۲	۱/۰۱	۰/۹۲	۰/۸۹	۰/۰۵۰
	۴	۰/۷۰ <sup>a</sup>	۰/۵۶ <sup>a</sup>	۰/۴۶ <sup>b</sup>	۰/۰۴۰
افریوسالکس <sup>۳</sup>	صفر	۰/۲۱ <sup>a</sup>	۰/۱۳ <sup>b</sup>	۰/۰۱ <sup>c</sup>	۰/۰۵۰
	۲	۰/۳۹ <sup>a</sup>	۰/۳۴ <sup>a</sup>	۰/۱۵ <sup>b</sup>	۰/۰۵۰
	۴	۰/۷۴ <sup>a</sup>	۰/۰۳ <sup>b</sup>	۰/۰۴ <sup>b</sup>	۰/۰۹۰
انتودینیوم <sup>۴</sup>	صفر	۶۲/۰۳ <sup>b</sup>	۶۸/۰۸ <sup>b</sup>	۷۰/۵۳ <sup>a</sup>	۰/۸۰۰
	۲	۸۳/۸۰	۸۱/۲	۸۳/۸۴	۱/۶۸۰
	۴	۶۷/۷۰ <sup>a</sup>	۵۴/۰۰ <sup>b</sup>	۵۰/۳۰ <sup>c</sup>	۱/۵۰۰
ایپیدینیوم <sup>۵</sup>	صفر	۴/۴۵ <sup>c</sup>	۵/۶۹ <sup>d</sup>	۶/۷۳ <sup>a</sup>	۰/۱۴۰
	۲	۷/۲۴ <sup>b</sup>	۸/۲۶ <sup>a</sup>	۸/۷۹ <sup>a</sup>	۰/۲۷۰
	۴	۵/۹۱ <sup>a</sup>	۴/۸۹ <sup>d</sup>	۴/۳۵ <sup>b</sup>	۰/۲۰۰
کل جمعیت پروتوزوا <sup>۶</sup>	صفر	۶۹/۳۹ <sup>c</sup>	۷۶/۰۴ <sup>b</sup>	۷۹/۵۳ <sup>a</sup>	۰/۷۰۰
	۲	۹۶/۵۰	۹۴/۳۰	۹۴/۸۰	۱/۷۰۰
	۴	۷۸/۵۰ <sup>a</sup>	۶۲/۲۰ <sup>b</sup>	۵۶/۰۰ <sup>c</sup>	۱/۴۵۰

۱- وجود حروف غیر مشابه در هر سطر، نشان‌دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارهاست ( $p < 0.05$ )

۲- تیمار شاهد، فاقد پسماند رستوران، تیمار ۵۰: جایگزینی ۵۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران، تیمار ۱۰۰: جایگزینی ۵۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران

۳- نتایج گزارش شده در جدول با استفاده از روش شمارش با میکروسکوپ حاصل شده است.

۴- ۱- *Holoticha*، ۲- *Diplodinium*، ۳- *Opharyoscolex*، ۴- *Entodinium*، ۵- *Epidinium*، ۶- *Total protozoa*. خطای استاندارد میانگین‌ها

گروه دریافت‌کننده جو بود (جدول ۱). شاید افزایش چربی جیره در این امر بی‌تاثیر نبوده است. از طرف دیگر جنکینز و مک کوثر (۱۰) نشان دادند اسیدهای چرب غیر اشباع با ایجاد پوشش روی الیاف منجر به کاهش جمعیت باکتریایی و پروتوزوایی می‌شوند. کاهش در تعداد پروتوزوا و باکتری‌های گرم منفی، عموماً با کاهش بازچرخ نیتروژن در شکمبه نیز همراه می‌باشد. در تحقیق حاضر افزایش سطح پسماند رستوران در جیره منجر به کاهش میزان نیتروژن آمونیاکی (هرچند غیرمعنی‌دار) در شکمبه گردید (جدول ۴) که همسو با کاهش جمعیت پروتوزوای شکمبه در برهه‌های آزمایشی نیز بود ( $p < 0.05$ ) (جدول ۳). از طرف دیگر بر اساس برخی تحقیقات، گونه انتودینیوم، سریعاً باکتری‌ها را می‌بلعد و مشارکت زیادی در بازچرخ نیتروژن باکتریایی در شکمبه دارد. این گونه به‌عنوان گونه غالب در برخی آزمایشات که کنسانتره بالایی به حیوان تغذیه شده‌بود مشاهده گردید که احتمالاً بدلیل تحمل بیشتر آنها به pH پایین بود. به علاوه جمعیت گونه اپیدینیوم در جیره‌های بر پایه جو افزایش یافت. علت این امر احتمالاً بواسطه توانایی گونه اپیدینیوم در هیدرولیز بتاگلوکان‌های موجود در دانه جو بوده است (۷).

یکی دیگر از نکات قابل توجه، بالاتر بودن تعداد کل پروتوزوا در زمان صفر در جیره‌های حاوی پسماند رستوران بود که در ۴ ساعت پس از خوراک‌دهی با افزایش میزان پسماند در جیره از جمعیت پروتوزوا کاسته شد. البته روند کاهش تعداد پروتوزوا در پاسخ به افزایش پسماند رستوران در جیره در جنس‌های پروتوزوایی یکسان نبوده و در برخی جنس‌ها بسیار مشهود و تأثیرگذار و در برخی دیگر بسیار کم رنگ‌تر بود. بعنوان مثال جنس انتودینیوم بعنوان گونه غالب، و جنس‌های هولوتریش و افریوسالکس در مقایسه با جنس‌های دیپلودینیوم و انتودینیوم کاهش جمعیت چشمگیرتری نشان دادند (جدول ۳). استفاده از سطوح مختلف پیه در جیره گوسفندان منجر به کاهش معنی‌داری در جمعیت هولوتریش در ۵ ساعت پس از تغذیه شده‌است (۹). جنس هولوتریش بواسطه داشتن ساختار ویژه و وجود پرز در سطح بدن نسبت به جیره‌هایی با سطوح بالای چربی حساس‌تر می‌باشند. در تحقیق مسانا و همکاران (۱۵) نیز استفاده از ۴ درصد چربی در جیره جمعیت پروتوزوایی را به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش داد هر چند از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نبود که محققین علت عدم معنی‌دار بودن را تنوع بالای جمعیت پروتوزوایی ذکر کردند.

بر اساس گزارش فرانزولین و دهوری (۵) pH شکمبه بر جمعیت پروتوزوایی تأثیر مستقیم دارد. این محققین، عواملی غیر از pH پایین شکمبه نظیر طول مدت زمانی که pH شکمبه پایین بوده است، طول زمان زادآوری پروتوزوا و سرعت خروج مواد از شکمبه<sup>۲</sup> را بر بقای پروتوزوا در شکمبه موثر دانستند. با مصرف جیره‌های غذایی که حاوی کنسانتره به مقدار زیاد می‌باشد، تعداد پروتوزوا عموماً کاهش می‌یابد که احتمالاً بدلیل فقدان مواد الیافی شاور در شکمبه (تله الیاف) بعنوان جایگاه اتصال پروتوزوها به‌منظور تکثیر آنها چنین نتایجی را در پی دارد (۲۱). بر همین اساس ناگارا و تیگمایر

با افزایش سطح پسماند رستوران و کاهش جو در جیره، جنس دیپلودینیوم کاهش نشان داد. این نتایج با نتایج فرانزولین و دهوری (۵) که سطوح مشابهی از نسبت علوفه به کنسانتره را در جیره گوساله‌ها استفاده نمودند، مطابقت ندارد. دلیل این اختلاف، احتمالاً در ماهیت ماده خوراکی جایگزین جو بر جمعیت این جنس از پروتوزوا می‌باشد. بیشترین تعداد جمعیت جنس دیپلودینیوم به هنگام استفاده از جیره مبتنی بر جو بود که تفاوت معنی‌داری را با سایر گروه‌های تغذیه‌ای نشان داد ( $p < 0.05$ ). جنس اپیدینیوم تفاوت معنی‌داری را در بین جیره‌ها نشان داد بطوریکه با افزایش سطح پسماند رستوران در جیره، جمعیت این جنس افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). روند تغییرات جمعیتی جنس افریوسالکس کاملاً برعکس جنس اپیدینیوم بود ( $p < 0.05$ ). دو گروه تاژکدار، زنجیره غذایی و متابولیسمی متفاوتی دارند چراکه هولوتریش‌ها عمدتاً کربوهیدرات‌های محلول را مورد استفاده قرار می‌دهند در حالیکه انتودینیوم‌ها تکه‌های غذا را بلعیده و تخمیر می‌کنند. تاژکداران انتودینیوم‌ها معمولاً دارای تعداد بیشتری در شکمبه بوده و از نظر بیوشیمیایی بهتر شناخته شده‌اند (۲۹). با افزایش سطح کنسانتره در جیره، تعداد جنس اپیدینیوم افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. جیره‌های با کنسانتره بالا معمولاً منجر به کاهش pH شکمبه می‌شوند (۵). بر اساس گزارش مارتین و همکاران (۱۳) افزایش مصرف جو در جیره منجر به افزایش جمعیت هولوتریش در محتویات شکمبه گردید. در تحقیق حاضر نیز جیره‌های حاوی جو افزایش جمعیت بیشتری را در مقایسه با پسماند رستوران برای هولوتریش‌ها به همراه داشتند (جدول ۳). بر اساس نتایج بدست آمده، جمعیت پروتوزوایی شکمبه در ۲ ساعت بعد از مصرف خوراک افزایش قابل توجهی یافت (بطور میانگین حدود ۲۷ درصد) (جدول ۳). افزایش بیشتر جمعیت پروتوزوایی در حیواناتی که از جو تغذیه می‌کردند، یکی از نکات قابل توجه در این مورد به شمار می‌رود بطوری که در این گروه حیوانات افزایش حدود ۳۹ درصدی جمعیت پروتوزوایی روی داد ( $69/39$  در مقابل  $104 \times 96/5$  در هر میلی‌لیتر)، در حالیکه در گروه تغذیه شده با پسماند رستوران افزایش جمعیت حدود ۱۹ درصد بود ( $79/53$  در مقابل  $104 \times 94/8$  در هر میلی‌لیتر). به‌نظر می‌رسد دانه جو می‌تواند به‌عنوان منبع غنی نشاسته‌ای، سوبسترای مناسبی برای پروتوزوها در ساعت‌های اولیه پس از تغذیه باشد. با توجه به کاهش pH شکمبه، جمعیت پروتوزوا در ۴ ساعت پس از مصرف خوراک در تمامی گروه‌ها کاهش یافت و همانگونه که قبلاً نیز اشاره شد کاهش جمعیت در گروه مصرف‌کننده پسماند رستوران بسیار مشهودتر بود ( $p < 0.05$ ) (جدول ۳ و ۴). بطور جالب توجهی، جمعیت پروتوزوا در ۴ ساعت پس از تغذیه، در گروه دوم یعنی گروه دریافت‌کننده جو و پسماند رستوران نیز از گروه دریافت‌کننده جو پایین‌تر بود (جدول ۳). این در حالیست که تفاوتی در pH شکمبه بین دو گروه وجود نداشت. لذا نسبت دادن کاهش جمعیت پروتوزوا تنها به کاهش pH شکمبه شاید قانع‌کننده نباشد. مقایسه جیره‌های گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد میزان عصاره اتری یا چربی جیره در این گروه تقریباً دو برابر

(۱۷) عنوان کردند کاهش جمعیت پروتوزوای شکمبه می‌تواند یک شاخص خوب از اسیدوز حاد و تحت حاد ناشی از تجمع اسید لاکتیک یا اسیدهای چرب فرار در شکمبه باشد.

#### غلظت متابولیت‌ها و pH شکمبه

pH شکمبه و غلظت متابولیت‌های شکمبه‌ای در جدول ۴ گزارش شده است. تفاوت معنی‌داری در pH و غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه بین تیمارها وجود داشت ( $p < 0.05$ ) (جدول ۴). pH شکمبه بره‌های تیمار سوم که در آن ۱۰۰ درصد دانه جو با پسماند رستوران جایگزین گردید، بطور معنی‌داری پایینتر از تیمار کنترل و تیمار ۵۰ درصد بود ( $p < 0.05$ ). کاهش pH شکمبه می‌تواند ناشی از تخمیر سریع‌تر و افزایش نسبت مولی اسیدهای چرب فرار در شکمبه باشد. در آزمایش حاضر نیز نسبت مولی اسیدهای چرب فرار در این تیمار بالاتر از تیمارهای دیگر بوده و pH را کاهش داده است. اما نتایج جدول ۵ این موضوع را نقض می‌کند. بر اساس نتایج جدول ۵ جیره‌های حاوی جو تقریباً در تمامی زمان‌های انکوباسیون میزان گاز بیشتری در مقایسه با تیمار

پسماند رستوران داشتند ( $p < 0.05$ ). این امر به مفهوم تخمیرپذیری بالاتر جو و نسبت مولی بالاتر اسیدهای چرب فرار می‌باشد. بره‌های آزمایشی در انتهای دوره آزمایش کشتار شدند و بطور جالب توجهی پرزهای بافت شکمبه در بره‌هایی که پسماند رستوران بطور کامل جایگزین دانه جو شده بود کراتینه شده بودند (نتایج منتشر نشده). دلیل این امر روشن نیست اما می‌تواند بدلیل تغییر الگوی تخمیر و بالاتر بودن نسبت مولی اسیدهای چرب در شکمبه و بدنبال آن کراتینه شدن پرزهای شکمبه باشد (۲۶). کاهش جذب اسیدهای چرب فرار در شکمبه این بره‌ها احتمالاً دلیل اصلی افزایش نسبت مولی اسیدهای چرب که منجر به پایین‌تر بودن pH شکمبه در بره‌های مذکور می‌باشد.

در آزمایشی که روی بره‌های پرواری دلاق و با همین نسبت دانه جو در جیره انجام شده بود میزان pH شکمبه بالاتر از نتایج آزمایش حاضر و در محدوده ۶/۵ بود. بنظر می‌رسد بره‌ها در آزمایش حاضر با اسیدوز تحت حاد شکمبه‌ای درگیر بودند (۲۵).

جدول ۴- تاثیر جیره‌های آزمایشی بر pH و متابولیت‌های شکمبه‌ای ۴ ساعت پس از تغذیه

تیمارهای آزمایشی				شاهد	جیره‌های آزمایشی
SEM <sup>۱</sup>	۱۰۰	۵۰	۵/۷۷ <sup>a</sup>		
۰/۰۴	۵/۵۹ <sup>b</sup>	۵/۷۷ <sup>a</sup>	۵/۷۴ <sup>a</sup>	۵/۷۴ <sup>a</sup>	pH
۰/۴۵	۹۱/۰۵ <sup>a</sup>	۷۱/۰۴ <sup>b</sup>	۷۱/۱۰ <sup>b</sup>	۷۱/۱۰ <sup>b</sup>	T-VFA(mg/dl)
۰/۷۳	۱۲/۷۰	۱۳/۳۰	۱۳/۶۰	۱۳/۶۰	NH <sub>3</sub> -N(mg/dl)

T-VFA = کل اسیدهای چرب فرار شکمبه ( میلی گرم در دسی لیتر) و NH<sub>3</sub>-N = نیتروژن آمونیاکی شکمبه (میلی گرم در دسی لیتر)

- وجود حروف غیر مشابه در هر سطر، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهاست ( $p < 0.05$ )

- تیمار شاهد، فاقد پسماند رستوران، تیمار ۵۰: جایگزینی ۵۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران، تیمار ۱۰۰: جایگزینی ۱۰۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران  
۱. خطای استاندارد میانگین‌ها

#### نتایج آزمایش تولید گاز

میزان گاز تولیدی ناشی از تخمیر مواد غذایی و فراسنجه‌های مرتبط با تخمیر در ساعات ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ پس از انکوباسیون در جدول ۵ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که در ۲ ساعت اول انکوباسیون، تفاوتی در میزان تخمیر یا گاز تولیدی بین خوراک‌های مورد آزمایش وجود نداشت. با سپری شدن زمان انکوباسیون در

ساعات‌های ۴، ۶، ۸ و ۱۲ میزان تولید گاز در دانه جو و مخلوط مساوی دانه جو و پسماند رستوران، به‌طور معنی‌داری از پسماند رستوران به‌تنهایی بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). از ساعت ۱۶ انکوباسیون به بعد، تولید گاز در دانه جو به‌طور معنی‌داری از سایر خوراک‌های مورد آزمایش بیشتر شد و این روند تقریباً تا اتمام دوره انکوباسیون ادامه یافت ( $p < 0.05$ ).

جدول ۵- میزان تولید گاز خوراک‌های آزمایشی در زمان‌های انکوباسیون و فراسنجه‌های مربوطه (میلی لیتر در گرم ماده خشک)

زمان‌های انکوباسیون (ساعت)										نمونه خوراک
C <sup>۲</sup>	(a+b) <sup>۱</sup>	۴۸	۳۶	۲۴	۱۶	۱۲	۸	۶	۴	
۰/۱۰۷ <sup>b</sup>	۳۴۱/۱ <sup>a</sup>	۳۴۰/۹ <sup>a</sup>	۳۳۷/۳ <sup>a</sup>	۳۰۵/۹ <sup>a</sup>	۳۷۵/۷ <sup>a</sup>	۲۴۲/۴ <sup>a</sup>	۱۹۱/۶ <sup>a</sup>	۱۴۱/۹ <sup>a</sup>	۹۷/۷ <sup>a</sup>	شاهد
۰/۱۳۱ <sup>a</sup>	۳۰۰/۷ <sup>b</sup>	۳۰۵/۷ <sup>b</sup>	۲۹۵/۵ <sup>b</sup>	۲۸۲/۱ <sup>b</sup>	۲۵۸/۲ <sup>b</sup>	۲۳۵/۲ <sup>a</sup>	۱۹۶/۱ <sup>a</sup>	۱۵۳/۸ <sup>a</sup>	۱۰۷/۹ <sup>a</sup>	۵۰
۰/۰۹۹ <sup>b</sup>	۲۹۴/۵ <sup>b</sup>	۲۹۴/۳ <sup>b</sup>	۲۸۲/۶ <sup>b</sup>	۲۶۳/۸ <sup>b</sup>	۲۳۵/۳ <sup>c</sup>	۲۰۴/۷ <sup>b</sup>	۱۵۸/۸ <sup>b</sup>	۱۲۳/۳ <sup>b</sup>	۸۵/۴ <sup>b</sup>	۱۰۰
۰/۰۰۵	۱۱/۴۳	۱۱/۸۳	۹/۱۳	۶/۴۶	۴/۵۵	۴/۲۱	۶/۰۸	۴/۷۳	۳/۴۲	SEM <sup>۳</sup>

\*: حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین نمونه‌ها است ( $p < 0.05$ ).

۱. ماده خشک با قابلیت تولید گاز، ۲. ثابت نرخ تولید گاز، ۳. خطای استاندارد میانگین‌ها

تیمار شاهد، فاقد پسماند رستوران، تیمار ۵۰: جایگزینی ۵۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران، تیمار ۱۰۰: جایگزینی ۱۰۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران

و تخمیرپذیری را در بین خوراک‌های مورد آزمایش داشت. کمتر بودن میزان تولید گاز پسماند رستوران، احتمالاً به‌علت بالا بودن میزان چربی و اثرات سوء آن بر میکروارگانیسم‌های شکمبه بوده است. مجموع تولید گاز بخش محلول و

به‌نظر می‌رسد در ساعات‌های ابتدایی تخمیر، مخلوط دانه جو و پسماند رستوران شرایط مناسبی همانند دانه جو و حتی تاحدودی بهتر برای استفاده میکروارگانیسم‌ها فراهم کرده است. پسماند رستوران به‌تنهایی کمترین میزان تولید گاز

سوم با جایگزینی ۱۰۰ درصد جو با پسماند رستوران کمترین تعداد پروتوزوا را دارا بودند. نکته حائز اهمیت این است که روند کاهش جمعیت پروتوزوایی همزمان با افزایش مصرف پسماند رستوران در هر دو روش مشهود است. میزان بالای خطای استاندارد میانگین‌ها در روش مولکولی حاکی از این است که دقت این روش در آزمایش حاضر برای روش شمارش مستقیم بالاتر بوده است. اما بدلیل اینکه خطای استاندارد میانگین‌ها در روش مولکولی بسیار بالا بود لذا بر خلاف روش میکروسکوپی، جمعیت پروتوزوا در گروه‌ها تفاوت معنی‌دار نشان ندادند (جدول ۶).

غیرمحلول (a+b) دانه جو به طور معنی‌داری از پسماند رستوران و مخلوط پسماند رستوران و دانه جو بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). با این حال نرخ تولید گاز مخلوط مساوی پسماند رستوران و دانه جو (۰/۱۳۱) به‌طور معنی‌داری از دانه جو (۰/۱۰۷) و پسماند رستوران (۰/۰۹۹) بیشتر بود ( $p < 0.05$ ).  
**مقایسه نتایج بررسی میکروسکوپی با روش مولکولی**  
مقایسه نتایج شمارش پروتوزوا با روش‌های میکروسکوپی (شمارش مستقیم) و مولکولی در جدول ۶ گزارش شده است. همانگونه که مشخص است روش مولکولی تخمین بالاتری از جمعیت پروتوزوایی در مقایسه با روش شمارش مستقیم داشت بدین مفهوم که گروه شاهد در هر دو روش بالاترین و گروه

جدول ۶- جمعیت کل پروتوزای شکمبه در بره‌های تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی ( $\times 10^4$ )  
Table 6. Ruminal protozoa count in the rumen of lambs fed experimental rations ( $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ )

تیمارهای آزمایشی			
خطای استاندارد میانگین‌ها	۱۰۰	۵۰	شاهد
۵۰/۰۰	۸۰	۱۳۰	۱۹۰
۱/۴۵	۵۶/۰۰ <sup>c</sup>	۶۲/۲۰ <sup>d</sup>	۷۸/۵۰ <sup>a</sup>

وجود حروف غیر مشابه در هر سطر، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهاست ( $p < 0.05$ ).  
Real Time PCR\*

تیمار شاهد، فاقد پسماند رستوران، تیمار ۵۰: جایگزینی ۵۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران، تیمار ۱۰۰: جایگزینی ۵۰ درصد جو جیره با پسماند رستوران

جمعیت بالاتر پروتوزوایی و تنوع بیشتر در شمارش آنها با روش مولکولی در تحقیق حاضر نیز بدرستی این نکته را تأیید می‌کند.

با توجه به اینکه آزمایشات پیشین نشان داده‌اند که جایگزینی پسماند رستوران با دانه جو در جیره تفاوتی بر عملکرد بره‌های پرواری نداشت (۱۶) لذا به‌عنوان یک خوراک با ارزش قابل استفاده است. اما با توجه به تأثیری که بر جمعیت پروتوزوا و pH شکمبه دارد در استفاده از آن به‌ویژه در سطوح بالای جیره در نشخوارکنندگان بایستی احتیاط لازم را بعمل آورد.

روش‌های میکروسکوپی مزایای متعددی نسبت به روش‌های مولکولی بر پایه PCR در مطالعه پروتوزوا دارد. اول اینکه بخش عمده‌ای از مؤکداران روده‌ای از نظر مورفولوژیکی مشخص شده‌اند ولی توالی ژنی رفرنسی برای 18S rRNA برای بسیاری از جنس‌ها و گونه‌های دیده شده وجود ندارد. دوم اینکه پراکندگی در تعداد کپی‌های ژن‌های RNA ریبوزومی در بین جنس‌های مختلف یا تحت شرایط متفاوت رشد ممکن است موجب خطا در نسبت‌های مشاهده شده این جنس‌ها گردد. مطالعات انجام گرفته با استفاده از پیمایش ژن 18S rRNA حاکی از تنوع بالاتر مؤکداران بیش از آنچه که با روش‌های مرسوم مورفولوژیکی حاصل می‌شود، دارد (۱۸).

## منابع

1. Broderick, G.A. and J.H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63: 64-75.
2. Dehority, B.A. 2005. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum* and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. *Journal of Eukaryot Microbiol*, 52: 339-342.
3. Denman, S.E., N.W. Tomkins and C.S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology*, 62: 313-322.
4. Fedorak, P.M. and D.E. Hurdey. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environment Technology*, 4: 425-432.
5. Franzolin, R. and B.A. Dehority. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *Journal of Animal Science*, 74: 2803-2809.
6. 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.
7. Hristov, A.N., M. Ivan, L.M. Rode and T.A. McAllister. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium or high concentrate barley-based diets. *Journal of Animal Science*, 79: 515-524.
8. Ivan, M., P.S. Mir, K.M. Koenig, L.M. Rode, L. Neill, T. Entz and Z. Mir. 2001. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Ruminant Research*, 41: 215-227.

9. Jafari khorshidi, K., S.M. Ashabi and M. Rezaeeian. 2009. Effect of different levels of dietary tallow on microbial protein synthesis and protozoa population changes in the rumen of sheep. *Animal Science*, 2-2: 57-64.
10. Jenkins, T.C. and M.A. McGuire. 2006. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 89-4: 1302-1310.
11. Jouany, J.P. and K. Ushida. 1999. The Role of protozoa in feed digestion-a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 12-1: 113-128.
12. Markham R. 1942. A steam distillation apparatus suitable for micro-kjeldahl analysis. *Biochemical Journal*, 36: 790-791.
13. Martin, C. and B. Michalet-Doreau. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67: 407-413.
14. Menke, K.H. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Reserch and Development*, 28: 7-55.
15. Messana, J.D., T.T. Berchielli, P.B. Arcuri, A.F. Ribeiro, G. Fiorentini and R.C. Canesin. 2012. Effects of different lipid levels on protozoa population, microbial protein synthesis and rumen degradability in cattle. *Acta Scientiarum Maringá*, 34-3: 279-285.
16. Moradi, M., A. Hosseinkhani, A. Taghizadeh, S. Alijani and H. Daghigh Kia. 2013. Replacement of dietary barley grain by different levels of restaurant waste and its effect on hybrid lambs performance. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 5-1: 29-38 (In Persian).
17. Nagaraja, T.G. and E.C. Titgemeyer. 2007. Rumen acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science*, 90: E17-E38.
18. Newbold, C.J., G. de la Fuente, A. Belanche, E.I. Ramos-Morales and N.R. McEwan. 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-14.
19. NRC (National Research Council). 1985. Nutrient requirements of sheep (6<sup>th</sup> edn). Subcommittee on Sheep Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council. National Academy Press: Washington, D.C., USA.
20. Oldrick, B.S. and J.L. Firkins. 2000. Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. *Journal of Animal Science*, 78: 2412-2420.
21. Owens, F.N., D.S. Secrist, W.J. Hill and D.R. Gill. 1998: Acidosis in cattle-a review. *Journal of Animal Science*, 76: 275-286.
22. Regensbogenova, M., S. Kisidayova, T. Michalowski, P. Javorsky, S.Y. Moon-van der Staay, G.W. Moon-van der Staay, J. Hackstein, N.R. McEwan, J.P. Jouany, J.C. Newbold and P. Pristas. 2004. Rapid identification of rumen protozoa by restriction analysis of amplified 18S rRNA gene. *Acta Protozoologica*, 43: 219- 224.
23. Russel, J.B. 2002. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. 1st ed. Ithaca, NY.
24. SAS Institute. 2001. SAS/STAT user's guide. SAS Institute Inc, Cary.
25. Shahabi, H., Y. Chashnidel, A. Teimori Yansari and S.A. Jafarpour. 2016. Effect of oregano essential oil and canola oil on apparent digestibility, ruminal pH and ammonia and carcass quality characteristics of fattening *Dalagh* lambs. *Research on Animal Production*, 7-13: 127-135.
26. Steele, M.A., J. Croom, M. Kahler, O. AlZahal, S.E. Hook, K. Plaizier and B.W. McBride. 2011. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 300-6: 1515-1523.
27. Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.
28. Westendorf, M.L., Z.C. Dong and P.A. Schoknecht. 1998. Recycled cafeteria food waste as a feed for swine: nutrient content, digestibility, growth, and meat quality. *Journal of Animal Science*, 76: 2976-2983.
29. Williams, A.G. 1986. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological Reviews*, pp: 25-49.



## Effect of Ration Fermentability on Ruminal Protozoa Population of Finishing Lambs

Ali Hosseinkhani<sup>1</sup>, Mahdi Moradi<sup>2</sup> and Gholamreza Hamidian<sup>3</sup>

1- Associated Professor, Department of Animal Science, University of Tabriz,  
(Corresponding author: a.hosseinkhani@tabrizu.ac.ir)

2- M.Sc. Graduated, Department of Animal Science, University of Tabriz

3- Assistant Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary  
Medicine, University of Tabriz

Received: Jun 19, 2018      Accepted: March 2, 2019

### Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of ration fermentability on ruminal protozoa population during different hours after feeding. Fifteen hybrid Ghezel\*Arkhar-merino male lambs were fed experimental rations. Experimental rations were contain different levels of barley grain and restaurant waste. Restaurant waste was substituted barley grain at the levels of 50 and 100 percent. Ruminal fluid was gotten from the lambs before and 2 and 4 hours after feeding. Rations fermentability was determined using gas production technique. The results showed that barley grain had higher fermentability (about 16%) than restaurant waste during 48 hours of incubation (341 vs 294 ml/g DM for barley grain and restaurant waste respectively). It also had higher constant of degradability (0.107 vs 0.099 for barley grain and restaurant waste, respectively). The rations containing restaurant waste resulted to higher pH and molar proportions of total VFA ( $P<0.05$ ). Total protozoa counts were highest and lowest for restaurant waste and barley grain before feeding ( $79.5$  vs  $69.4 \times 10^4$  for restaurant waste and barley grain, respectively). No differences in the protozoa count was found among the treatments during two hours after feeding, but restaurant waste containing ration resulted to the lowest and conversely barley ration resulted to the highest protozoa count four hours after feeding ( $56$  vs  $78.5 \times 10^4$  for restaurant waste and barley grain rations, respectively). It seems that higher fat content and lower pH of ration containing restaurant waste are the main causes of lower protozoa count, so more attention should be take place when high levels of restaurant waste is used in the ruminants ration.

**Keywords:** Barley Grain, Finishing Lambs, Gas Production Technique, Protozoa Count, Restaurant Waste, Ruminal Ph, VFA