



## "مقاله پژوهشی"

# بهبود ارزش تغذیه‌ای برگ کنار (*Ziziphus Spina-Christi*) با استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده تانن جدا شده از شکمبه

زهرا جهان‌آرا<sup>۱</sup> و مرتضی چاچی<sup>۲</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، اهواز، ایران  
۲- استاده، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، اهواز، ایران، (نویسنده مسوول: chajhi@asnruckh.ac.ir)  
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۲۹ صفحه: ۸۴ تا ۹۴

### چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** تانن‌ها دارای اثرات محدود کنندگی فراوانی بر خوشخوراکی و مصرف خوراک، هضم مواد مغذی، رشد و عملکرد دام هستند. گیاهان و محصولات جانبی زیادی وجود دارند که به علت بالا بودن مقدار ترکیبات ضد تغذیه‌ای نظیر تانن استفاده از آن‌ها در خوراک دام، محدود است. استفاده از روش‌هایی که بتواند مقدار این ترکیبات را کاهش دهد، امکان استفاده از آنها در خوراک دام را فراهم خواهد کرد. هدف آزمایش حاضر بهبود ارزش تغذیه‌ای برگ کنار حاوی تانن و ترکیبات پلی فنولیک برای نشخوارکنندگان بود.

**مواد و روش‌ها:** برگ کنار با چهار نوع از باکتری‌های تجزیه کننده تانن شامل *کلیسیلا پنومونیه* و *استرپتوکوکوس* (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، *لاکتو باسیلوس فرمتوم* (جداسازی شده از شکمبه بز نجدی) و *لاکتو باسیلوس فرمتوم* تجاری عمل آوری شدند. در دو مرحله ترکیب شیمیایی و قابلیت هضم و تخمیر برگ کنار به تنهایی یا به صورت ترکیب در یک جیره استاندارد بره‌ی پرواری با روش‌های آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی در مرحله اول و دوم هر کدام شامل ۵ تیمار بودند، ۱- برگ کنار یا جیره‌های حاوی آن بدون عمل آوری، ۲ تا ۵- برگ کنار یا جیره‌های حاوی آن که با هر یک از چهار باکتری به صورت جداگانه عمل آوری شدند.

**یافته‌ها:** پتانسیل تولید گاز، نرخ تولید گاز، ماده آلی واقعا تجزیه شده، بازده تولید توده زنده میکروبی، غلظت نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوای برگ کنار عمل آوری شده با باکتری‌های تجزیه کننده تانن نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). درصد قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF برگ کنار عمل آوری شده با باکتری‌های تجزیه کننده تانن نیز نسبت به شاهد افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). در مرحله دوم آزمایش، پتانسیل تولید گاز، درصد قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF، غلظت نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوای جیره‌های بره‌ی پرواری حاوی برگ کنار عمل آوری شده نسبت به شاهد افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). نرخ تولید گاز، ضریب تفکیک، تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی در جیره‌های حاوی برگ کنار عمل آوری شده نسبت به شاهد تنها عددی افزایش یافت و از نظر آماری معنی‌دار نبود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد با توجه به اثرات مثبت فراوری برگ کنار با باکتری‌های تجزیه کننده تانن، شاید بتوان گفت عمل آوری این گیاه برای کاهش تانن راهکاری مناسب برای استفاده بهینه‌تر از برگ کنار در جیره است.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم تاناز، پتانسیل تولید گاز، توده زنده میکروبی، غلظت تانن، قابلیت هضم

### مقدمه

کنار با نام علمی *Ziziphus Spina-Christi* گونه اسپیناکریستی، از خانواده *رامناسه*<sup>۱</sup> (عنابیان) و جنس *زیزیفوس* است. درخت کنار در استان‌های خوزستان (خرمشهر، اندیمشک، شوشتر، مسجدسلیمان و بهبهان)، فارس، لرستان، بوشهر، کرمان، هرمزگان و بلوچستان وجود دارد (۱۰). در جهان بیشتر در شمال و شرق آفریقا، عربستان، فلسطین، سوریه، لبنان، عراق، جنوب ایران، افغانستان و پاکستان می‌روید (۴۱). در بررسی فیتوشیمیایی عصاره گیاه کنار، وجود آلکالوئید، فلاونوئید، تانن، ساپونین و گلیکوزید به مقدار زیاد اثبات شده است (۴، ۴۱). مقدار تانن در برگ خشک کنار ۳۱/۹۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک است (۱۷).

کنار گیاهی مقاوم به خشکی و بومی مناطق جنوبی ایران است که بعد از کاشت به مراقبت کمی نیاز دارد و در شرایط کاملاً مرطوب هم به خوبی در شرایط خشک رشد می‌کند. همچنین در خاک‌های غیر حاصلخیز و فقیر، بطور وسیع در نواحی خشک و نیمه‌خشک، مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و در کنار دریا تا ارتفاع ۱۲۵۰ متری از سطح دریا در مناطق جنوبی ایران رویش دارد. توسعه کاشت این درخت بدلیل داشتن خواص دارویی مفید، غذایی و اقتصادی خاص آنها، از نظر تأثیر بر مسائل زیست‌بوم و جلوگیری از فرسایش خاک در مناطق

جنوبی کشور مورد توجه است (۱۵، ۴۱). بعد از لیگنین، تانن فراوان‌ترین گروه فنلی گیاه است (۲۱). اثرات محدودکنندگی تانن‌ها را می‌توان به کاهش استفاده از مواد مغذی، به ویژه پروتئین، کاهش رشد و عملکرد، کاهش خوشخوراکی و مصرف خوراک و کاهش در فعالیت آنزیم‌های گوارشی ارتباط داد (۲۳، ۳۵). در کنار اثرات ضد تغذیه‌ای در غلظت زیاد، اثر مثبت تانن‌های متراکم در غلظت بهینه شامل بهبود افزایش وزن زنده، جلوگیری از نفخ، افزایش تولید شیر، افزایش نرخ تخم‌ریزی و درصد بره‌زایی، کاهش نماتودهای رودهای و کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی و متان در شکمبه است (۲۳).

گیاهان و محصولات جانبی زیادی وجود دارند که به علت بالا بودن مقدار ترکیبات ثانویه و ضد تغذیه‌ای نظیر تانن استفاده از آن‌ها در خوراک دام، محدودیت دارد (۳، ۴۵). بکاربردن روش‌هایی که بتواند مقدار این ترکیبات را کاهش دهد، امکان استفاده از آنها در خوراک دام را فراهم خواهد کرد (۹، ۲۳). روش‌های کاهش تانن شامل فراوری با خاکستر چوب (۹)، سیلو کردن و تجزیه بیولوژیکی (۲۱) هستند. در کنار روش‌های شیمیایی برای تانن‌زدایی، روش‌های بیولوژیکی نیز وجود دارد (۱۳، ۳۱). در نشخوارکنندگانی نظیر گاو، گوسفند و بز میکروارگانیسم‌هایی نظیر *استرپتوکوکوس بوویس*<sup>۲</sup>، *استرپتوکوکوس کاپرینوس*<sup>۳</sup>، *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس*<sup>۴</sup> و

1- Rhamnaceae

2- Streptococcus bovis

3- S. caprinus

4- S. gallotlicu

گوزن، لاکتو باسیلوس فرمنتوم<sup>۲</sup> (تعداد معادل ۱۰<sup>۷</sup> cfu) جدا سازی شده از شکمبه بز نجدی و لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری (تعداد معادل ۱۰<sup>۷</sup> cfu) که قادر به تولید آنزیم تاناز بودند برای عمل آوری برگ کنار مورد استفاده قرار گرفتند.

**آماده‌سازی مایع تلقیح باکتری‌های ها:** برای تلقیح یک لوب از هر جدا به باکتریایی (غیر از فرمنتوم تجاری)، به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت برات<sup>۸</sup> اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد، سپس این محیط کشت به یک لیتر محیط نوترینت برات تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و جهت عمل آوری برگ کنار استفاده شد (۳۰).

**آماده‌سازی مایع تلقیح فرمنتوم تجاری:** یک لوب سویه باکتریایی لاکتوباسیلوس فرمنتوم روی پلیت حاوی محیط کشت MRS - آگار به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد، یک کلنی از باکتری به مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر به محیط کشت MRS منتقل شده و برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد و جهت عمل آوری برگ کنار استفاده شد (۷، ۱۳).

**اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی:** ترکیبات شیمیایی برگ کنار شامل پروتئین خام (روش کج‌لدال، کج‌لدال اتوماتیک، مدل ۷۵۰ صنایع آزمایشگاهی بخشی تهران، ایران)، چربی خام (روش سوکسله)، ماده خشک، خاکستر، لیاف نامحلول در شونده اسیدی (ADFom) و تانن کل با روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (۶). لیاف نامحلول در شونده خنثی (NDFom) نیز بدون استفاده از آنزیم آلفا آمیلاز و سولفیت سدیم و با حذف خاکستر (۵۱) انجام شد.

#### تیمارهای آزمایشی

در مرحله ی اول، از پنج تیمار آزمایشی شامل ۱- شاهد (برگ کنار خام یا بدون عمل آوری)، ۲- برگ کنار عمل آوری شده با کلبسیلا پنومونیه (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، ۳- برگ کنار عمل آوری شده با/استیتو باکتر (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، ۴- برگ کنار عمل آوری شده با لاکتو باسیلوس فرمنتوم (جداسازی شده از شکمبه بز نجدی)، ۵- برگ کنار عمل آوری شده با لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری، استفاده شد.

در مرحله ی دوم، از برگ کنار خام یا عمل آوری با باکتری‌های تجزیه کننده تانن، برای تهیه ی جیره آزمایشی بره‌های پرواری استفاده شد. در این مرحله از آزمایش از یک جیره پایه بره پرواری حاوی ۶۰ درصد کنسانتره و ۴۰ درصد علوفه که بر اساس جداول انجمن ملی تحقیقات (۳۶) تنظیم شده بود استفاده شد. در این مرحله نیز از ۵ تیمار آزمایشی استفاده شد: تیمار ۱- جیره ی شاهد (حاوی برگ کنار خام یا عمل آوری نشده)، تیمار ۲- جیره ی حاوی برگ کنار عمل آوری شده با کلبسیلا پنومونیه (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، ۳- جیره ی حاوی برگ کنار عمل آوری شده با/استیتو باکتر (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، ۴- جیره ی حاوی برگ کنار عمل آوری شده با لاکتو باسیلوس فرمنتوم (جداسازی شده از شکمبه بز نجدی)، ۵- جیره ی حاوی برگ کنار عمل آوری شده با لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری (جدول ۱).

سلونوماناس رومینانتیوم<sup>۱</sup> شناسایی شدند که در تجزیه زیستی تانن شرکت دارند (۲۴). میکروارگانیسم‌های زیادی دارای پتانسیل تولید تاناز هستند، اما بیشتر قارچ‌های رشته‌ای جنس اسپیریلیوس برای تولید تاناز استفاده شده است (۸). تاناز می‌تواند با شکستن برخی پیوندهای موجود بین پلیمرهای دیواره سلولی، برای تجزیه دیواره سلولی گیاهان نیز استفاده شود (۲۰، ۳۰). تجزیه تاناز توسط کلبسیلا پنومونیه سویه‌های A1 تا A9 جداسازی شده از شکمبه گوزن (۳۰، ۳۱) و سایر سویه‌های کلبسیلا پنومونیه (۲۷). یا تجزیه ی تانیک اسید توسط سویه‌های مختلف C2A تایید شده است (۳۱). سویه‌های مختلف باکتری کلبسیلا پنومونیه از مدفوع بزهای تغذیه شده با جیره‌های غنی از تانن جدا شده است (۴۸).

لاکتوباسیلوس‌ها جزو میکروارگانیسم‌ها پروبیوتیک هستند و با تولید ترکیبات آلی نظیر لاکتیک اسید، هیدروژن پراکسید، استیک اسید و افزایش اسیدیته روده از استقرار بسیاری از باکتری‌های مضر جلوگیری می‌کنند. لاکتوباسیل‌ها یکی از باکتری‌های مهم تولیدکننده اسیدلاکتیک هستند (۲۰). بیشتر لاکتوباسیل‌های مورد استفاده برای تهیه سیلاز از مواد مشتق شده از گیاه، از جمله علوفه تازه، سیلو و غیره جدا شده‌اند (۲۰)؛ با این حال، لاکتوباسیل‌های مشتق از منابع گیاهی اغلب نمی‌توانند عملکرد حیوانات را بهبود بخشند (۴۳). درحالی‌که لاکتوباسیل‌های جدا شده از روده حیوان می‌تواند از لاکتوباسیل‌های استخراج شده از سایر منابع دیگر، اثرات مفیدتری بر عملکرد حیوان داشته باشد (۲۶). لاکتوباسیلوس پلاننتاروم و پدیوکوکوس اسیدیلکتیکا<sup>۳</sup> جدا شده از مدفوع گوساله می‌توانند در ارتقای عملکرد حیوانات موثر باشند (۲۰). تخمیر با لاکتوباسیلوس پلاننتاروم<sup>۳</sup> باعث کاهش ۳۳/۶۹ درصدی سطوح تانن و اسیدفیتیک در آرد سورگوم شد (۴۴). تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر تاناز باکتریایی بر ارزش تغذیه‌ای برگ کنار انجام نشده است. بعلاوه، در هیچ مطالعه‌ای اثرات چند نوع از باکتری‌های تولید کننده ی تاناز به‌طور هم‌زمان برای بهبود کیفیت گیاهان تانن‌دار از نظر هضم و تخمیر مورد مقایسه قرار نگرفته است. بنابراین هدف پژوهش حاضر مقایسه ی اثرات استفاده از برخی از باکتری‌های تولیدکننده تاناز برای بهبود ارزش تغذیه‌ای برگ کنار به عنوان یک گیاه حاوی تانن است.

#### مواد و روش‌ها

آزمایش‌های حاضر در آزمایشگاه‌ها و ایستگاه آموزشی - پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. برگ‌ها از درختان کنار واقع در بخش شمالی اهواز در منطقه ملاثانی جمع آوری شدند و به صورت تازه به قطعات ۳-۴ سانتی متری خرد شدند و در سایه در جریان هوای آزاد خشک شدند. باکتری‌های تجزیه کننده تانن در آزمایشگاه میکروبیولوژی شکمبه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان از شکمبه گوزن جداسازی شدند و توانایی تولید تاناز (آنزیم تجزیه کننده تانن) و تانن‌زدایی آنها در چندین آزمایش بررسی شد (۱۳، ۳۰، ۳۱). در این تحقیق باکتری‌های تجزیه کننده تانن شامل کلبسیلا پنومونیه<sup>۴</sup> (تعداد معادل ۱۰<sup>۷</sup> cfu) و استیتو باکتر<sup>۵</sup> (تعداد معادل ۱۰<sup>۷</sup> cfu) جداسازی شده از شکمبه

1- *Selenomonas ruminantium*  
5- Colony-forming unit

2- *Pediococcus acidilactici*  
6- *Acinetobacter sp.*

3- *Lactobacillus plantarum*  
7- *Lactobacillus fermentum*

4- *Klebsiila pneumonia*  
8- Nutrient broth

**آزمایش تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه:** به منظور بررسی مقدار گاز تولیدی و فراسنجه‌های تخمیر در برگ کنار و جیره‌های حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن از روش تولید گاز استفاده شد. برای این منظور قبل از وعده غذایی صبح از ۴ راس از گوسفندان نری که با جیره‌ی علف‌های تغذیه شده بودند، مایع شکمبه گرفته شد و بعد اختلاط بلافاصله توسط پارچه نخی متقال صاف شد. سپس در فلاسک آب گرم ۳۹ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شد. مقدار ۰/۲ گرم نمونه در ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. مقدار ۲۰ میلی‌لیتر بافر و ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه (نسبت ۲ به ۱) به آن اضافه شد. تولید گاز در زمان صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی شد (۲۸). داده‌های تولید گاز با استفاده از مدل نمایی تغییر یافته (۳۷) آنالیز شدند و ضرایب تولید گاز بدست آمد:

$$P = b(1 - e^{-ct})$$

در این معادله، P = تولید گاز، b = پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر)، c = ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، t = مدت زمان

انکوباسیون (ساعت)، e = عدد نبری بود. فراسنجه‌های تخمیری شامل عامل جداکننده (PF)، ماده آلی واقعا تجزیه شده، تولید توده زنده میکروبی با روش‌های پیشنهادی محاسبه شدند (۱۱). **آزمایش هضم دو مرحله‌ای:** تعیین قابلیت هضم مواد مغذی برگ کنار و جیره‌های حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن به روش هضم دو مرحله‌ای انجام شد. مایع شکمبه مانند آزمایش تولید گاز تهیه شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه و ۴۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی مخلوط شدند (نسبت ۱ به ۴) و در لوله‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری در بن ماری ۳۹ درجه سلسیوس قرار داده شد (۵۰). در ۴۸ ساعت بعد، به محیط کشت اسید کلریدیک ۲۰ درصد و آنزیم پیپسین اضافه شد (۰/۵ گرم آنزیم پیپسین ۳۳۰۰ در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدیک ۰/۱ نرمال). لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر در حمام آب گرم قرار داده شدند. در پایان روز چهارم، از اختلاف وزن نمونه اولیه و باقیمانده، پس از خشک کردن آنها در ۹۰ درجه سلسیوس، ۲۴ ساعت) قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- اجزای خوراک و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی حاوی برگ کنار

Table 1. Feed ingredients and chemical composition of experimental diets containing *Ziziphus Spina-Christi* leaves

| اجزای خوراک (درصد)                         | بدون عمل‌آوری | عمل‌آوری با باکتری‌ها |
|--|---------------|-----------------------|
| علوفه یونجه                                | ۱۵/۰          | ۱۵/۰                  |
| کاه گندم                                   | ۲۵/۰          | ۲۵/۰                  |
| برگ کنار                                   | ۲۰/۰          | ۲۰/۰                  |
| دانه جو                                    | ۲۰/۰          | ۲۰/۰                  |
| دانه ذرت                                   | ۳/۵           | ۳/۵                   |
| سبوس گندم                                  | ۰             | ۰                     |
| کنجاله سویا                                | ۱۵/۰          | ۱۵/۰                  |
| نمک طعام                                   | ۰/۵           | ۰/۵                   |
| مکمل ویتامینی- معدنی <sup>۲</sup>          | ۱/۰           | ۱/۰                   |
| ترکیب شیمیایی (درصد)                       |               |                       |
| الیاف نامحلول در شوینده خنثی               | ۴۱/۶۰         | ۴۰/۵۰                 |
| الیاف نامحلول در شوینده اسیدی              | ۳۳/۲۱         | ۳۰/۱۲                 |
| ماده آلی                                   | ۹۳/۰          | ۹۳/۰                  |
| پروتئین خام                                | ۱۳/۱۶         | ۱۳/۱۶                 |
| انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری بر کیلوگرم) | ۲/۵۵          | ۲/۵۵                  |

۱- در این تحقیق از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل *کلیسیلا پنومونیه* و *استینتو باکتر* جداسازی شده از شکمبه گوزن، *لاکتو باسیلوس فرمتوم* جدا سازی شده از شکمبه بز نجدی و *لاکتو باسیلوس فرمتوم* تجاری که قادر به تولید آنزیم تاناز بودند استفاده شد.  
 ۲- هر کیلوگرم مکمل حاوی: ۵۰۰۰۰ واحد بین مللی در میلی‌گرم ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین مللی در میلی‌گرم ویتامین D3، ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۱۸۰ گرم در کیلوگرم کلسیم، ۶۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر، ۶۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سدیم، ۱۹۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم منیزیم، ۳۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی، ۳۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آهن، ۱۹۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم منگنز، ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس، ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کبالت، ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم، ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ید و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آنتی‌اکسیدان.

**شمارش پروتوزوا:** پس از تهیه مایع شکمبه، برای ثابت کردن (کشتن) پروتوزوا، از محلول ثابت‌کننده فرم آلدهید ۱۰ درصد با نسبت مساوی با مایع شکمبه استفاده شد. از لام هموسایتومتر برای شمارش تعداد پروتوزواها استفاده شد (۱۶).  
**تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH شکمبه:** به‌منظور تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی در روز ۱۹، ۳ ساعت بعد از مصرف خوراک صبحگاهی، نمونه‌برداری از مایع شکمبه توسط لوله معدی انجام شد. سپس بلافاصله pH آن توسط دستگاه pH متر (مدل WTW 3110، ساخت آلمان) اندازه‌گیری شد. پس از صاف کردن با پارچه متقال چهار لایه به مقدار مساوی با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال (۱۶/۷ میلی‌لیتر اسید کلریدریک مرک ۳۷ درصد در یک لیتر آب مقطر) مخلوط شد و جهت

اندازه‌گیری بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در نهایت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Bio-Rad, Libra S22, England) اندازه‌گیری شد (۱۲).  
**تجزیه و تحلیل آماری:** داده‌های حاصل با نرم افزار آماری SAS (نسخه‌ی ۹/۴) با رویه‌ی خطی عمومی (GLM) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها برای اثر معنی‌دار توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵ درصد انجام گرفت. از مدل آماری زیر استفاده شده است:

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

که در این مدل،  $Y_{ij}$ : مقدار مشاهده شده،  $\mu$ : میانگین جامعه،  $T_i$ : اثر تیمار  $i$ ام،  $\varepsilon_{ij}$ : اثرات خطای آزمون است.

**نتایج و بحث**

**مقایسه ارزش تغذیه‌ای برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن**

ترکیبات شیمیایی برگ کنار: مقدار پروتئین، NDF و ADF و تانن کل برگ کنار در آزمایش حاضر به ترتیب، ۱۲/۷۱، ۳۶/۷۶، ۲۳/۶۸، ۶/۱۹ بود (جدول ۲). در پژوهشی مقدار پروتئین خام برگ کنار هندی ۱۴/۵، ایاف نامحلول در شوینده خشی ۳۳/۹، ایاف نامحلول در شوینده اسیدی ۱۸/۵ و تانن کل ۳/۵۹ بود (۱۵). دلیل اختلاف در نتایج احتمالا به علت مرحله رویشی، فصل جمع‌آوری، محل نمونه برداری و قسمت نمونه برداری (مثلا شاخه‌ها، برگ‌ها یا ساقه نرم) باشد (۹،۴۱).

استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری برگ کنار، بجز کاهش ۳۳ درصدی تانن کل، بر سایر ترکیبات شیمیایی اندازه‌گیری شده در آزمایش حاضر تاثیری نداشت (جدول ۲). در پژوهشی با افزودن پلی اتیلن گلیکول و یا اوره (خشی‌کننده اثر تانن) به محصولات فرعی پسته، غلظت ماده

خشک، پروتئین خام، NDF و ADF تغییر چندانی نداشت، اما تانن کل به ترتیب حدود ۴۷ و ۳۲ درصد کاهش یافت که موافق با نتایج آزمایش حاضر بود؛ به‌علاوه غلظت کل ترکیبات فنولی و تانن‌های متراکم نیز به طور متوسط ۱/۲۲ و ۰/۳۹ درصد کاهش نشان داد (۳۲). سیلو کردن و مکمل کردن با پلی اتیلن گلابیکول نیز تاثیری بر ماده خشک، NDF و ADF نداشت (۳۴).

فرآوری زیستی مغز میوه‌ی بلوط با باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم منجر به کاهش غلظت فنل کل، فنل غیرتاننی، تانن کل، تانن متراکم و تانن قابل هیدرولیز به ترتیب به مقدار ۳۹، ۲۴، ۴۹، ۴۹/۵ و ۵۹ درصد شد (۷). در تحقیقی که با هدف بررسی اثر ریزوپوس الیگوسپروس، لاکتوباسیلوس پلاتناروم و ساکارومایسس سرویسیه بر تجزیه تانن و اسید فیتیک آرد سورگوم انجام شد، سطح تانن و اسیدفیتیک در آرد سورگوم به‌ترتیب ۳۳/۶۹ و ۴۴/۶۵ درصد کاهش یافت (۴۴).

جدول ۲- ترکیب شیمیایی برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن

| ماده خشک | پروتئین | NDF   | ADF   | ماده آلی | خاکستر | تانن کل           | تیمار   |
|----------|---------|-------|-------|----------|--------|-------------------|---|
| ۶۹/۵۰    | ۱۲/۷۱   | ۳۶/۷۶ | ۲۳/۶۸ | ۹۱/۰     | ۹/۰    | ۶/۱۹ <sup>a</sup> | برگ کنار بدون عمل‌آوری                                      |
| ۷۲/۵۵    | ۱۲/۵۸   | ۳۶/۴۹ | ۲۳/۶۶ | ۱        | -      | ۴/۱۶ <sup>b</sup> | برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری کلبسیلا پنومونیه            |
| ۷۰/۵۵    | ۱۲/۵۱   | ۳۶/۶۶ | ۲۳/۵۹ | -        | -      | ۴/۱۶ <sup>b</sup> | برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری استیتو باکتر                |
| ۷۲/۵۰    | ۱۲/۴۹   | ۳۶/۶۸ | ۲۳/۶۸ | -        | -      | ۴/۱۰ <sup>b</sup> | برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم جداشده |
| ۷۰/۵۶    | ۱۲/۶۶   | ۳۶/۶۶ | ۲۳/۶۷ | -        | -      | ۴/۱۶ <sup>b</sup> | برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری  |
| ۱/۰۶     | ۰/۹۴۵   | ۰/۴۷۶ | ۰/۴۴۷ | -        | -      | ۰/۲۱              | SEM   |
| ۰/۳۰۰    | ۰/۹۰۰   | ۰/۹۰۰ | ۰/۹۰۰ | -        | -      | ۰/۰۳۴             | p-value   |

باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل کلبسیلا پنومونیه و استیتو باکتر از شکمبه گوزن و لاکتوباسیلوس فرمنتوم از شکمبه بز نجدی جداسازی شده بودند. SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

a-b: در هر ستون، تفاوت میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) می‌باشد. ۱- اندازه‌گیری نشده است.

**پتانسیل و نرخ تولید گاز برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن**

استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن (کلبسیلا پنومونیه، گونه‌های مختلف استیتو باکتر، لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری و لاکتوباسیلوس فرمنتوم جداشده از شکمبه بز) در عمل‌آوری برگ کنار به عنوان گیاهان تانن‌دار، باعث افزایش معنی‌دار پتانسیل و نرخ تولید گاز نسبت به شاهد (برگ کنار بدون عمل‌آوری) شد (جدول ۳). بیشترین پتانسیل تولید گاز در برگ کنار عمل‌آوری شده با استیتو باکتر و کمترین در تیمار بدون عمل‌آوری (شاهد) مشاهده شد. بیشترین نرخ تولید گاز در برگ کنار عمل‌آوری با لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری و جدا شده از شکمبه‌ی بز و کمترین در شاهد مشاهده شد.

نتایج فراسنجه‌های تخمیری گاز برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در جدول ۳ نشان داده شد. تاثیر استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری برگ کنار بر ماده آلی واقعا تجزیه شده معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ )

و بیشترین مقدار در برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم جداشده از شکمبه‌ی بز نجدی مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) که اختلاف آن با سایر تیمارها به جز برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری معنی‌دار بود. کمترین مقدار تولید گاز در تیمار شاهد مشاهده شد که اختلاف آن نسبت به همه‌ی تیمارها معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). اختلاف بین تیمارها از لحاظ تولید توده میکروبی در برگ کنار معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). تیمار شاهد کمترین و تیمار برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم جداشده از شکمبه‌ی بز نجدی بیشترین مقدار تولید توده میکروبی را داشت ( $p < 0.05$ ) که البته با تیمار عمل‌آوری با باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری اختلافی نداشت؛ اما مقدار هر دو نسبت به شاهد و سایر تیمارها به طور معنی‌دار بیشتر بود؛ اختلاف سایر تیمارها با شاهد معنی‌دار نبود. اثر تیمارها بر مقدار PF و بازده تولید توده میکروبی معنی‌دار نبود.

جدول ۳- پتانسیل، نرخ تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن  
Table 3. Potential and rate of gas production and fermentative parameters of *Ziziphus Spina-Christi* leaves treated with tannin-degrading bacteria

| p-value | SEM   | تیمارها (باکتری استفاده شده برای عمل‌آوری) |                     |                     |                     |                     |
|---------|-------|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|         |       | LBFC                                       | LBF                 | ASB                 | KPB                 | CNT                 |
| ۰/۰۲۰۰  | ۹/۷۴  | ۵۷/۹۳ <sup>b</sup>                         | ۶۴/۰۳ <sup>b</sup>  | ۹۸/۳۸ <sup>a</sup>  | ۸۵/۷۶ <sup>ab</sup> | ۵۷/۶۷ <sup>b</sup>  |
| ۰/۰۰۰۱  | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۳۹ <sup>a</sup>                         | ۰/۰۳۵ <sup>ab</sup> | ۰/۰۳ <sup>b</sup>   | ۰/۰۳ <sup>b</sup>   | ۰/۰۳ <sup>c</sup>   |
| ۰/۰۰۱۰  | ۲/۸۷  | ۱۵۵/۴۷ <sup>ab</sup>                       | ۱۶۵/۱۰ <sup>a</sup> | ۱۴۸/۹۲ <sup>b</sup> | ۱۴۸/۶۲ <sup>b</sup> | ۱۴۰/۷۰ <sup>c</sup> |
| ۰/۲۲۰۰  | ۰/۸۸  | ۶/۴۳                                       | ۵/۷۶                | ۴/۳۶                | ۴/۱۹                | ۳/۳۱                |
| ۰/۰۴۰۰  | ۱۳/۵۵ | ۱۰۰/۶۹ <sup>a</sup>                        | ۱۰۰/۸۵ <sup>a</sup> | ۵۸/۹۳ <sup>b</sup>  | ۵۶/۲۰ <sup>b</sup>  | ۴۷/۰۷ <sup>b</sup>  |
| ۰/۱۱۰۰  | ۸/۸۵  | ۶۴/۶۸                                      | ۶۱/۰۲               | ۴۰/۰۷               | ۳۷/۷۱               | ۳۳/۴۸               |

شاهد (بدون عمل‌آوری، CNT)، باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل کلبسیلا پنومونیه (*KPB*) و استینتو باکتر (*ASB*) جدا شده از شکمبه گوزن، لاکتو باسیلوس فرمنتوم (*LBFC*) جدا شده از شکمبه بز نجدی و نیز لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری (*LBFC*) بود.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

a-c: در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) می‌باشد.

آوری شده با لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری و کلبسیلا پنومونیه مشاهده شد، از بین این دو نیز کلبسیلا پنومونیه به لحاظ عددی بیشتر بود. اثر تیمارهای آزمایشی بر نرخ تولید گاز معنی‌دار نبود. استفاده از جیره‌های حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تولیدکننده تانن تاثیر معنی‌داری بر ماده آلی واقعا تجزیه شده، عامل تفکیک کننده (PF)، تولید توده‌ی میکروبی و بازده تولید توده‌ی میکروبی (جدول ۴) نداشت.

### پتانسیل، نرخ تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری جیره‌های حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن

استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری برگ کنار باعث افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) پتانسیل تولید گاز تیمارها عمل‌آوری شده نسبت به شاهد (برگ کنار بدون عمل‌آوری) شد (جدول ۴). بیشترین پتانسیل تولید گاز در تیمار عمل

جدول ۴- پتانسیل، نرخ تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری جیره‌های حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن  
Table 4. Potential and rate of gas production and fermentative parameters of experimental diets containing *Ziziphus Spina-Christi* leaves treated with tannin-degrading bacteria

| p-value | SEM   | تیمارها (باکتری استفاده شده برای عمل‌آوری) |                    |                     |                     |                    |
|---------|-------|--|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
|         |       | LBFC                                       | LBF                | ASB                 | KPB                 | CNT                |
| ۰/۰۰۸   | ۵/۵۶  | ۸۵/۰۳ <sup>a</sup>                         | ۶۶/۶۷ <sup>b</sup> | ۶۳/۳۳ <sup>bc</sup> | ۷۳/۹۴ <sup>ab</sup> | ۵۲/۵۵ <sup>c</sup> |
| ۰/۶۴    | ۰/۰۰۷ | ۰/۰۷                                       | ۰/۰۶۸              | ۰/۰۷                | ۰/۰۶۹               | ۰/۰۸               |
| ۰/۱۵    | ۳/۱۳  | ۱۵۶/۶                                      | ۱۶۰/۶۸             | ۱۵۶/۵۵              | ۱۵۵/۵               | ۱۵۶/۹              |
| ۰/۲۴    | ۰/۵۰  | ۳/۴۴                                       | ۵/۱۳               | ۴/۱۸                | ۴/۵۲                | ۳/۹۰               |
| ۰/۱۴    | ۹/۴۳  | ۶۰/۳۶                                      | ۹۱/۷۶              | ۷۲/۶۳               | ۷۹/۳۷               | ۵۵/۱۱              |
| ۰/۲۴    | ۰/۰۶۴ | ۳۷/۸۹                                      | ۵۷/۱۱              | ۴۶/۵۶               | ۵۱/۰۶               | ۳۵/۰۶              |

شاهد (بدون عمل‌آوری، CNT)، باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل کلبسیلا پنومونیه (*KPB*) و استینتو باکتر (*ASB*) جدا شده از شکمبه گوزن، لاکتو باسیلوس فرمنتوم (*LBFC*) جدا شده از شکمبه بز نجدی و نیز لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری (*LBFC*) بود.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

a-c: در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) می‌باشد.

فراهمی آن‌ها را برای میکروب‌ها کاهش می‌دهد (۱۳،۲۳،۳۹). لذا شاید دلیل بهبود فراسنجه‌های تخمیری در آزمایش حاضر در حین عمل‌آوری با باکتری‌های تولیدکننده تانن، تجزیه تانن و از بین بردن اثرات منفی آن باشد. مشابه با نتایج آزمایش حاضر، سایر پژوهش‌ها نیز اثر مثبت تانن‌زدایی بر بهبود فراسنجه‌های تولید گاز را نشان دادند. در آزمایشی که با هدف بررسی اثر اسپرس آبی و دیم (منابع غنی از تانن) عمل‌آوری شده با آب یا اوره (به‌منظور تانن‌زدایی) بر جمعیت میکروبی شکمبه، فراسنجه‌های تولید گاز و خصوصیات تخمیر برون‌تنی انجام شد، تانن‌زدایی اسپرس آبی با آب و اوره باعث افزایش پتانسیل و نرخ تولید گاز، بهبود عامل تفکیک کننده (PF)، تولید توده میکروبی و بازده تولید توده‌ی میکروبی شد (۵۳). عمل‌آوری سیلاژ محصولات فرعی پسته با پلی اتیلن گلیکول (مهار کننده تانن‌ها) پتانسیل تولید گاز، انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی را در مقایسه با محصولات فرعی پسته تازه و سیلاژ بدون عمل‌آوری افزایش داد (۳۲).

شاید دلیل کم بودن پتانسیل و سایر فراسنجه‌های تولید گاز در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای عمل‌آوری شده با باکتری، مقدار بیشتر تانن در آن‌ها باشد و دلیل بهبود نتایج آزمایش حاضر شاید تجزیه تانن برگ کنار توسط باکتری‌های تولیدکننده تانن باشد (۴۷). به‌طوری‌که تانن دانه انگور و شاه‌بلوط (۴۰)، تفاله و پوست انار (۲۵) و اسپرس (۵۳) نیز باعث کاهش تولید گاز جیره‌های تحت آزمایش شد. تانن‌ها و مواد فنی با تشکیل پیوند و کمپلکس با مواد مغذی شامل کربوهیدرات، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، غشای سلولی باکتری و آنزیم‌های هضم‌کننده پروتئین و کربوهیدرات باعث کاهش دسترسی میکروارگانیزم‌های شکمبه به آن‌ها و در نتیجه کاهش تجزیه آن‌ها می‌شوند (۱۳،۲۳). به‌علاوه، فعالیت ضد میکروبی تانن‌ها مربوط به تداخل با آنزیم‌های خارج سلولی ترشح شده، تغییرات مورفولوژیکی در دیواره سلولی آن‌ها، بی‌ثباتی غشاء سیتوپلاسمی و پلاسمایی، اثر مستقیم بر متابولیسم میکروبی از طریق مهار چرخه فسفوریلاسیون-اکسیداتیو بوده و با محدود کردن سوبسترا برای رشد میکروبی و باند کردن کاتیون‌ها،

### نیترن آمونیاکی، pH و جمعیت پروتوزوای برگ کنار و جیره‌های حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در آزمایش تولید گاز

تاثیر استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری برگ کنار بر غلظت نیترژن آمونیاکی و pH شکمبه معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). همه‌ی تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد نیترژن آمونیاکی و pH بیشتری داشتند (جدول ۵). بیشترین غلظت نیترژن آمونیاکی در تیمار عمل‌آوری با/استیتینو باکتر جدا شده از شکمبه‌ی گوزن بود که نسبت به همه‌ی تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت؛ کمترین مقدار نیز در تیمار شاهد مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). pH مایع شکمبه در همه‌ی تیمارهای عمل‌آوری شده با باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد (بدون عمل‌آوری) بود ( $p < 0.05$ ). بیشترین مقدار pH مربوط به عمل‌آوری با باکتری کلسیلا پنومونیه و استیتینو باکتر بود و کمترین مقدار در تیمار شاهد مشاهده شد.

اثر استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری برگ کنار بر غلظت نیترژن آمونیاکی جیره‌های حاوی این گیاه معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). برای همه‌ی جیره‌های حاوی برگ کنار، افزودن باکتری تانن‌زدا باعث افزایش غلظت نیترژن آمونیاکی و pH شد (جدول ۵). بیشترین غلظت نیترژن آمونیاکی در تیمار عمل‌آوری با باکتری کلسیلا پنومونیه و کمترین در تیمار شاهد مشاهده شد. بیشترین مقدار pH در تیمار حاوی استیتینو باکتر و کمترین در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۵).

اثر استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در عمل‌آوری برگ کنار بر جمعیت پروتوزوای برگ کنار و جیره‌های آزمایشی حاوی برگ کنار معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) و باعث افزایش جمعیت کل پروتوزوآ شد. بیشترین جمعیت پروتوزوآ در تیمار حاوی باکتری کلسیلا پنومونیه و کمترین در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۵).

کاهش کمتر pH در تیمارهای عمل‌آوری شده با باکتری نسبت به تیمارهای حاوی برگ کنار بدون عمل‌آوری نیز نظیر نیترژن آمونیاکی، نشان‌دهنده تجزیه تانن توسط آن‌ها و کاهش اثر تانن بر pH در تیمارهای حاوی باکتری می‌باشد. شاید دلیل کاهش pH در تیمار شاهد (بدون عمل‌آوری) تولید اسیدهای چرب فرار به‌ویژه اسید پروپیونیک بیشتر در اثر تجزیه ترکیبات فنولی بوده که قادرند سطح pH شکمبه را کاهش دهند (۴۲). کاهش غلظت نیترژن آمونیاکی در تیمار شاهد و افزایش آن پس از تانن‌زدایی با باکتری‌های مورد استفاده در آزمایش حاضر، می‌تواند به دلیل وجود تانن (جدول ۲) و ترکیبات پلی‌فنولی در این مواد خوراکی باشد. تانن‌ها با اتصال به پروتئین و کاهش نرخ تجزیه پذیری پروتئین سبب کاهش غلظت نیترژن آمونیاکی می‌شوند (۲۳، ۳۵، ۴۷)؛ در نتیجه تانن‌زدایی توسط باکتری‌های استفاده شده در آزمایش حاضر منجر به رفع این مانع می‌شود. به‌علاوه، تانن موجود در خوراک ممکن است با کاهش جمعیت پروتوزوایی نیز باعث ممانعت از تجزیه پروتئین میکروبی توسط پروتوزوآها شده باشد (۴۶). افزودن مکمل پلی اتیلن گلیکول به‌عنوان باند کننده‌ی تانن سبب افزایش تعداد پروتوزوآ شد (۱، ۵۲). استفاده از منابع

تانن‌داری نظیر تفاله انگور در جیره گوسفند (۱)، عصاره پوست انار در جیره‌ی گاوهای شیرده (۲) باعث کاهش غلظت نیترژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوای شکمبه شد، اما تاثیری بر pH شکمبه نداشتند. این موید فرضیه‌ی اثر منفی تانن و ترکیبات پلی فنلی بر جمعیت پروتوزوآ است. در مقایسه با تیمار شاهد (فاقد عصاره پوست انار)، عمل‌آوری جیره‌ی بره‌های پروراری با سطوح مختلف عصاره پوست انار (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد ماده خشک جیره) تا سطح ۲۵ درصد، تاثیری بر pH محیط کشت میکروارگانیزم‌ها در محیط آزمایشگاه نداشت؛ اما در سطوح بالاتر (۳۰ و ۳۵ درصد) pH کاهش یافت (۴۵)؛ هرچند، تیمارهای آزمایشی باعث کاهش معنی‌دار غلظت نیترژن آمونیاکی شدند (۴۵). در تحقیقی استفاده از عصاره تانن متراکم گیاه کالیاندر/کالوتیروس سبب کاهش غلظت نیترژن آمونیاکی شد (۴۹). پژوهشگران بیان کردند که استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن در جیره حاوی انجیر سفید تاثیری بر pH شکمبه‌ای نداشت (۱۴).

تلقیح باکتری استرپتوکوکوس گالولیتیکوس و استرپتوکوکوس کاپرینوس به‌عنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن با استفاده از مایع شکمبه بزهای فرال به گوسفندان تغذیه شده با آکاسیا (حاوی تانن)، سبب بهبود قابلیت هضم پروتئین شد (۲۹). در آزمایش دیگری نیز تلقیح باکتری‌های مقاوم به تانن به بزهای فرال استرالیایی جیره‌های حاوی آکاسیا آنثورا (حاوی ۲۵-۵ درصد تانن متراکم) را به‌طور مطلوب‌تری نسبت به گوسفندان تحمل کردند و با تجزیه تانن منجر به هضم بیشتر پروتئین حین انکوبه کردن خوراک با مایع شکمبه گرفته شده از گوسفندان تغذیه شده با آکاسیا آنثورا شد. همچنین، تلقیح شکمبه‌ای باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت مقاوم به تانن به گوسفندان تغذیه شده با پوست بادام زمینی (۷/۱ درصد تانن متراکم)، نسبت به گروه شاهد اثر مطلوبی بر هضم پروتئین، کاهش دفع نیترژن و تعادل نیترژن داشت (۳۳). نتایج آزمایش حاضر یافته‌های این پژوهشگران را تایید می‌کند، به‌طوری که افزودن باکتری‌های تانن‌زدا در آزمایش حاضر باعث افزایش معنی‌دار غلظت نیترژن آمونیاکی در شکمبه شد که به مفهوم افزایش تجزیه‌ی پروتئین در اثر تجزیه‌ی تانن (جدول ۵) است. کاهش جمعیت پروتوزوآ در تیمار شاهد (بدون عمل‌آوری) و افزایش آن در حین عمل‌آوری با باکتری‌های تانن‌زدا، احتمالاً به دلیل ساختار پلی فنولی (نظیر تانن‌ها) موجود در این مواد خوراکی دارای تانن می‌باشد. این ساختارها منجر به پاره شدن غشاء سلول پروتوزوآ، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و کاهش سوبسترا و یون‌های فلزی مورد نیاز برای متابولیسم سلولی می‌شود (۱۹). افزودن مکمل پلی اتیلن گلیکول به‌عنوان یک باند کننده‌ی تانن سبب افزایش تعداد پروتوزوآ شد که در این میان تفاوت‌های گونه‌ای بین گوسفندان و بزها مشاهده شد و گوسفندان پاسخ بهتری از نظر افزایش تعداد پروتوزوآ نسبت به بزها نشان دادند (۵۲)؛ این موید فرضیه‌ی اثر منفی تانن و ترکیبات پلی فنلی بر جمعیت پروتوزوآ است. در پژوهشی با هدف بررسی تاثیر عمل‌آوری گیاه کنوکارپوس (حاوی تانن) با باکتری‌های تولید کننده تاناز، تعداد جمعیت پروتوزوآ بعد از عمل‌آوری افزایش یافت (۱۸). استفاده از منابع تانن‌داری نظیر تفاله

شکمبه نداشتند. افزودن پلی اتیلن گلیکول به جیره حاوی مواد تانن دار باعث افزایش جمعیت پروتوزوا و غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه شده است (۱).

انگور در جیره گوسفند (۱)، عصاره پوست انار در جیره گاوهای شیرده (۲) و بره‌های پرواری (۴۵،۴۶) و انواع منابع تانن دار در جیره‌های گاوهای گوشتی (۳۸) باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوای شکمبه شد، اما تاثیری بر pH

جدول ۵- تاثیر عمل‌آوری برگ کنار با باکتری‌های تجزیه کننده تانن بر جمعیت پروتوزوا، غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH در آزمایش تولید گاز  
Table 5. The effect of treating *Ziziphus Spina-Christi* leaves with tannin-degrading bacteria on protozoa population, ammonia nitrogen concentration, and pH in the gas production experiment

| p-value | SEM   | تیمارها (باکتری استفاده شده برای عمل‌آوری) |                     |                     |                    |                    | برگ کنار  |
|---------|-------|--|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---|
|         |       | LBFC                                       | LBF                 | ASB                 | KPB                | CNT                |   |
| ۰/۰۰۰۱  | ۰/۰۰۸ | ۶/۵۲ <sup>b</sup>                          | ۶/۴۵ <sup>c</sup>   | ۶/۵۷ <sup>a</sup>   | ۶/۵۷ <sup>a</sup>  | ۶/۳۵ <sup>d</sup>  | pH  |
| ۰/۰۰۰۴  | ۱/۵۴  | ۲۵/۹ <sup>b</sup>                          | ۲۴/۸۳ <sup>b</sup>  | ۳۴/۲۴ <sup>a</sup>  | ۲۴/۵۱ <sup>b</sup> | ۱۷/۵۵ <sup>c</sup> | نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)      |
| ۰/۰۰۰۱  | ۰/۰۰۲ | ۱۰/۰۰ <sup>b</sup>                         | ۱۰/۰۰ <sup>b</sup>  | ۱۰/۰۰ <sup>b</sup>  | ۱۳/۰۰ <sup>a</sup> | ۹/۰۰ <sup>c</sup>  | کل جمعیت پروتوزوا (تعداد سلول × ۱۰ <sup>۵</sup> ) |
|         |       |  |                     |                     |                    |                    | جیره‌های حاوی برگ کنار                            |
| ۰/۰۰۱   | ۰/۰۰۳ | ۶/۵۷ <sup>c</sup>                          | ۶/۵۳ <sup>d</sup>   | ۶/۷ <sup>a</sup>    | ۶/۶۱ <sup>b</sup>  | ۶/۳۵ <sup>e</sup>  | pH  |
| ۰/۰۰۰۱  | ۰/۲۱۱ | ۱۶/۵۴ <sup>d</sup>                         | ۲۳/۵۷ <sup>b</sup>  | ۱۹/۰۴ <sup>c</sup>  | ۲۸/۸۳ <sup>a</sup> | ۱۵/۶۳ <sup>c</sup> | نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)      |
| ۰/۰۴    | ۰/۵۰۰ | ۱۲/۵۰ <sup>ab</sup>                        | ۱۲/۰۰ <sup>ab</sup> | ۱۱/۵۰ <sup>bc</sup> | ۱۳/۵۰ <sup>a</sup> | ۱۰/۵۰ <sup>c</sup> | کل جمعیت پروتوزوا (تعداد سلول × ۱۰ <sup>۵</sup> ) |

شاهد (بدون عمل‌آوری، CNT)، باکتری‌های تجزیه کننده تانن شامل کلبسیلا پنومونیه (KPB) و استیپتو باکتر (ASB) جدا شده از شکمبه گوزن، لاکتو باسیلوس فرمنتوم (LBFC) جدا شده از شکمبه بز نجدی و نیز لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری (LBFC) بود.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

a-d: در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار (p < ۰/۰۵) می‌باشد.

تانن، به ترتیب موجب افزایش معنی‌دار ۳/۶، ۱۷/۳ و ۱۲/۶ درصدی قابلیت هضم پروتئین حقیقی، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی و خنثی نسبت به تیمار شاهد شد (۱۳). افزایش قابلیت هضم دیواره سلولی در نتیجه عمل‌آوری برگ‌های اوکالیپتوس و کنوکارپوس (حاوی تانن) با باکتری‌های تجزیه کننده تانن شامل گونه‌های مختلف استیپتو باکتر و کلبسیلا پنومونیه نیز در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است (۳۱، ۳۰). در مطالعه دیگری با استفاده از گل بو مادران و برگ اوکالیپتوس (حاوی ترکیبات پلی فنلی نظیر تانن)، قابلیت هضم دیواره سلولی یونجه کاهش یافت (۲۲). وجود تانن و مواد تانن دار در جیره‌های گاوهای گوشتی (۳۸) و شیرده (۵۴) اثری بر مصرف مواد مغذی (ماده خشک، ماده آلی، NDF، ADF و پروتئین خام) نداشت، اما منجر به کاهش قابلیت هضم مواد مغذی شد. از طرفی، در مقایسه با شاهد (فاقد عصاره پوست انار)، استفاده از عصاره پوست انار در جیره بره‌های پرواری (۴۵) و گاوهای شیرده (۲) تاثیری بر قابلیت هضم مواد مغذی (ماده خشک، ماده آلی، NDF، ADF و پروتئین خام) نداشت، اما قابلیت هضم پروتئین خام در بره‌ها کاهش یافت. دلیل تفاوت در نتایج، به مقدار و نوع تانن مورد استفاده و نظیر آن بر می‌گردد. برای نمونه، در مقایسه با شاهد و جیره‌های حاوی ۳ و ۴ درصد پوست انار، افزودن ۲ درصد پوست انار به جیره‌های گاوهای شیری باعث افزایش معنی‌دار مصرف خوراک و قابلیت هضم مواد مغذی (ماده خشک، ماده آلی، پروتئین، چربی، فیبر خام و NFE) شد (۳). از طرفی، مصرف و قابلیت هضم مواد مغذی گاوهای شیرده در جیره‌های حاوی ۳ درصد پوست انار با شاهد تفاوتی نداشت، اما در جیره‌های حاوی ۴ درصد پوست انار به‌طور معنی‌داری کمترین مقدار بود (۳). در مقایسه با تیمار شاهد (فاقد عصاره پوست انار)، عمل‌آوری جیره‌های بره‌های پرواری با سطوح مختلف عصاره پوست انار (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد ماده خشک جیره) تا سطح ۲۵ درصد، تاثیری بر قابلیت هضم آزمایشگاهی مواد مغذی نداشت؛ اما با افزودن سطوح بالاتر کاهش هضم مشاهده شد (۴۵).

### قابلیت هضم آزمایشگاهی برگ کنار و جیره‌های حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه کننده تانن

استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده تانن در عمل‌آوری برگ کنار (جدول ۶)، باعث افزایش معنی‌دار قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF نسبت به برگ کنار خام (شاهد) شد (p < ۰/۰۵)، اما تیمارهای آزمایشی (سایر تیمارها غیر از شاهد) نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند؛ به‌طوری‌که، بیشترین درصد قابلیت هضم ماده خشک مربوط به عمل‌آوری برگ کنار با باکتری استیپتو باکتر و بیشترین درصد قابلیت هضم NDF و ADF مربوط به عمل‌آوری با کلبسیلا پنومونیه بود. اثر استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده تانن در عمل‌آوری برگ کنار بر قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF همه‌ی جیره‌های آزمایشی نسبت به شاهد (حاوی برگ کنار بدون عمل‌آوری) معنی‌دار بود (p < ۰/۰۵). بیشترین درصد قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF در برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری کلبسیلا پنومونیه مشاهده شد (جدول ۶). قابلیت هضم همه‌ی تیمارهای حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده از تیمار شاهد بیشتر بود (p < ۰/۰۵)، اما بین تیمارهای عمل‌آوری شده با یکدیگر اختلافی مشاهده نشد.

با توجه به نتایج آزمایش حاضر با کاهش تانن توسط باکتری‌ها، فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک افزایش یافته است و این می‌تواند دلیلی برای افزایش قابلیت هضم ماده خشک و NDF باشد، زیرا تانن‌ها مانع هضم الیاف و پروتئین هستند (۳۱، ۳۰، ۳۱، ۲۳). لذا، رهاسازی مواد مغذی از اتصال تانن، بهبود قابلیت هضم مواد را به همراه داشته است (۱۹، ۳۱). تانن‌ها در غلظت بالا بسته به نوع، اثرات مهارتی زیادی بر جمعیت باکتری‌های فیبرولیتیک شکمبه دارند که منجر به کاهش هضم فیبر و قابلیت هضم آن می‌شوند (۱۹، ۴۶). استفاده از ۳-۲ درصد تانن گیاه کالیندرا در جیره، جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده فیبر را کاهش داد (۴۹). تخمیر کنجاله کانولای فرآوری شده با لاکتوباسیلوس پلانتراروم با کاهش ۴۴/۵ درصدی غلظت

جدول ۶- قابلیت هضم آزمایشگاهی برگ کنار و جیره‌های حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده با باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن  
 Table 6. The *in vitro* digestibility of *Ziziphus Spina-Christi* leaves and diets containing the treated *Ziziphus Spina Christi* leaves with tannin-degrading bacteria

| p-value | SEM   | تیمارها (باکتری استفاده شده برای عمل‌آوری) |                    |                    |                    |                    | برگ کنار               |
|---------|-------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
|         |       | LBFC                                       | LBF                | ASB                | KPB                | CNT                |                        |
| ./۰۰۰۱  | ۱/۰۹  | ۶۸/۶۳ <sup>a</sup>                         | ۶۸/۳۳ <sup>a</sup> | ۷۱/۸۹ <sup>a</sup> | ۶۹/۰۰ <sup>a</sup> | ۵۸/۹۷ <sup>b</sup> | ماده خشک               |
| ./۰۰۰۸  | ۲/۰۹  | ۶۲/۳۴ <sup>a</sup>                         | ۶۳/۵۷ <sup>a</sup> | ۶۱/۴۰ <sup>a</sup> | ۶۴/۵۲ <sup>a</sup> | ۵۶/۱۷ <sup>b</sup> | NDF                    |
| ./۰۰۰۱  | ۰/۷۶۱ | ۶۰/۷۳ <sup>a</sup>                         | ۵۹/۱۳ <sup>a</sup> | ۵۷/۹۶ <sup>a</sup> | ۶۲/۳۰ <sup>a</sup> | ۵۲/۸۲ <sup>b</sup> | ADF                    |
| ./۰۰۰۱  | ۰/۳۶۵ | ۷۰/۳۸ <sup>a</sup>                         | ۶۹/۵۲ <sup>a</sup> | ۶۸/۸۳ <sup>a</sup> | ۷۱/۸۴ <sup>a</sup> | ۶۴/۸۳ <sup>b</sup> | جیره‌های حاوی برگ کنار |
| ./۰۰۰۱  | ۰/۳۶۵ | ۷۰/۳۸ <sup>a</sup>                         | ۶۹/۵۲ <sup>a</sup> | ۶۸/۸۳ <sup>a</sup> | ۷۱/۸۴ <sup>a</sup> | ۶۴/۸۳ <sup>b</sup> | ماده خشک               |
| ./۰۵۰۰  | ۱/۹۴  | ۶۴/۹۲ <sup>a</sup>                         | ۶۳/۳۵ <sup>a</sup> | ۶۱/۰۱ <sup>a</sup> | ۶۶/۸۳ <sup>a</sup> | ۵۴/۴۴ <sup>b</sup> | NDF                    |
| ./۰۱۰۰  | ۱/۷۳  | ۵۹/۳۳ <sup>a</sup>                         | ۵۸/۰۳ <sup>a</sup> | ۵۷/۶۴ <sup>a</sup> | ۶۰/۷۳ <sup>a</sup> | ۴۹/۹۵ <sup>b</sup> | ADF                    |

شاهد (بدون عمل‌آوری، CNT)، باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن شامل کلبسیلا پنومونیه (KPB) و استیپتوباکتر (ASB) جداشده از شکمبه گوزن، لاکتوباسیلوس فرمنتوم (LBF) جدا شده از شکمبه بز نجدی و نیز لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری (LBFC) بود.

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

a-b: در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) می‌باشد.

### نتیجه‌گیری کلی

جیره‌ی حاوی برگ کنار عمل‌آوری شده با کلبسیلا پنومونیه و پتانسیل تولید گاز در تیمار کلبسیلا پنومونیه و لاکتوباسیلوس فرمنتوم تجاری؛ که از بقیه باکتری‌ها بیشتر بود، اختلافی برای سایر شاخصه‌های هضمی و تخمیری مورد مطالعه، بین انواع باکتری‌های تولیدکننده تاناز مورد مطالعه مشاهده نشد. لذا با توجه به اثرات مفید همه‌ی آنها، استفاده از این افزودنی‌های بیولوژیکی تولیدکننده تاناز مورد مطالعه در آزمایش را می‌توان در جیره توصیه کرد؛ و انتخاب نوع باکتری بسته به فراهم بودن آنها دارد. از طرفی، انجام پژوهش در محیط مزرعه‌ای نیز توصیه می‌شود.

نتایج آزمایش حاضر نشان داد که استفاده از باکتری‌های تولیدکننده تاناز (تجزیه‌کننده تانن) برای عمل‌آوری برگ کنار اگرچه تاثیری بر ترکیب شیمیایی آن نداشت، اما باعث کاهش غلظت تانن کل این برگ شد. کاهش غلظت تانن باعث بهبود قابلیت هضم مواد مغذی و فراسنجه‌های هضم و تخمیر برگ کنار و جیره‌های حاوی برگ کنار در آزمایش تولید گاز و هضم دو مرحله‌ای و در نتیجه افزایش ارزش تغذیه‌ای آنها شد. غیر از اختلاف معنی‌دار برای اثر بر غلظت نیتروژن آمونیاکی در

### منابع

- Abarghuei, M.J., Y. Rouzbehan and D. Alipour. 2010. The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, 132: 73-7.
- Abarghuei, M.J., Y. Rouzbehan, A.Z.M. Salem and M.J. Zamiri. 2013. Nutrient digestion, ruminal fermentation and performance of dairy cows fed pomegranate peel extract. *Livestock Science*, 157(2-3): 452-461.
- Abbas, S., A.A. Nada and S.H. Mohamed. 2019. Effect of dietary pomegranate peel (*Punica granatum*) supplementation on productive performance and immune status of Friesian dairy cows. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 22(2): 75-85.
- Abdel-Wahhab, M.A., E.A. Omara, M.M. Abdel-Galil, N.S. Hassan, S.A. Nada, A. Saeed and M.M. ElSayed. 2007. *Zizyphus spina-christi* extract protects against aflatoxin B1-intitiated hepatic carcinogenicity. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 4(3): 248.
- AMSA. 2012. Meat color measurement guidelines. Champaign, IL, USA: American Meat Science Association, 139 pp.
- AOAC. 2012. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists, 19<sup>th</sup> ed. Gaithersburg.
- Bahaaldini, R., M. Khajavi, R. Naghiha and S. Prsaei. 2018. Bioprocessing of acorn kernel with *Lactobacillus plantarum* to reduce its tannin. *Journal of Animal Science Research*, 28(2): 1-10 (In Persian).
- Batra, A. and R.K. Saxena. 2005. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process Biochemistry*, 40: 1553-1557.
- Ben Salem, H., S. Abidi, H. Makkar and A. Nefzaoui. 2005. Wood ash treatment, a cost-effective way to deactivate tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage and to improve digestion by Barbarine sheep. *Animal feed science and technology*, 122: 93-108
- Bina, F., Z. Zamani and V. Nazeri. 2012. Morph-based genetic variation in Christ's thorn (*Ziziphus spina-christi* (L.) Wild.). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 19(2): 274-288 (In Persian).
- Blummel, M., H. Steingab and K. Becker. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77: 911-921.
- Broderick, G.A., 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.

13. Chaji, M., E. Direkvandi and A.Z.M. Salem. 2020. Ensiling of *Conocarpus erectus* tree leaves with molasses, exogenous enzyme and *Lactobacillus plantarum* impacts on ruminal sheep biogases production and fermentation. *Agroforestry Systems*, 94: 1611-1623.
14. Chaudhary, L.C., N. Agarwal, V. Verma, K. Rikhari and D.N. Kamra. 2011. Effect of feeding tannin degrading bacteria (Isolate-6) on rumen fermentation, nutrient utilization and growth performance of goats fed on *Ficus infectoria* leaves. *Small ruminant research*, 99(2-3): 143-147.
15. Dashtizadeh, M., A.M. Kabirifard, H. Khaj and A. Kamali. 2019. Nutritive value of two species of *Ziziphus* (*Ziziphus spina-christi* and *Ziziphus mauritiana*) tree branches in sheep nutrition. *Journal of Animal Environmental Research*, 11(2): 69-76 (In Persian).
16. Dehority, B.A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 372 pp.
17. Elaloui, M., H. Ghazghazi, A. Ennajah, S. Manaa, W. Guezmir, N.B. Karray and A. Laamouri. 2017. Phenolic profile antioxidant capacity of five *Ziziphus spina-christi* (L.) provenances and their allelopathic effects on *Trigonella foenum-graecum* L. and *Lens culinaris* L. seeds. *Natural Product Research*, 31(10): 1209-1213.
18. Eydi pour, R. 2019. The effect of *Conocarpus* plant treated with tannase-producing bacteria on performance, digestibility and blood and ruminal factors of Arabi sheep. M.Sc. Thesis, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Molasani-ahvaz, Iran, 100 pp (In Persian).
19. Goel, G., A. Puniya, C. Aguilar and K. Singh. 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften*, 92: 497-503.
20. Guo, L., D. Yao, D. Li, Y. Lin, S. Bureenok, K. Ni and F. Yang. 2020. Effects of lactic acid bacteria isolated from rumen fluid and feces of dairy cows on fermentation quality, microbial community, and *in vitro* digestibility of alfalfa silage. *Frontiers in Microbiology*, 10(1): 1-11.
21. Hassan, Z.M., T.G. Manyelo, L. Selaledi and M. Mabelebele. 2020. The effects of tannins in monogastric animals with special reference to alternative feed ingredients. *Molecules*, 25(20): 4680.
22. Hozhabri, F., A. Shemshadi and F. Kafilzadeh. 2016. Effect of Yarrow flower (*Achillea millefolium*) and Eucalyptus leaf (*Eucalyptus globulus*) on *in vitro* digestibility of alfalfa hay. *Journal of Animal Science Research*, 25(3): 73-83 (In Persian).
23. Huang, Q., X. Liu, G. Zhao, T. Hu and Y. Wang. 2018. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, 4: 137-150.
24. Hiura, T., Y. Hashidoko, Y. Kobayashi and S. Tahara. 2010. Effective degradation of tannic acid by immobilized rumen microbes of a sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in winter. *Animal feed science and technology*, 155(1): 1-8.
25. Khorsandi, S., A. Riasi and M. Khorvash. 2018. Evaluating chemical composition, fatty acid profiles, antioxidant activity and nutritive value of pomegranate by-product using *in vitro* gas production technique. *Research on Animal Production*, 9(22): 92-100 (In Persian).
26. Khota, W., S. Pholsen, D. Higgs and Y. Cai. 2017. Fermentation quality and *in vitro* methane production of sorghum silage prepared with cellulase and lactic acid bacteria. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30: 1568-1574.
27. Kumar, M., V. Beniwal and R.K. Salar. 2015. Purification and characterization of a thermophilic tannase from *Klebsiella pneumoniae* KP715242. *Biocatalysis Agriculture Biotechnology*, 4(4): 745-751.
28. 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 Research Development*, 28: 7-55.
29. Min, B.R., K. Hernandez, W.E. Pinchak, R.C. Anderson, J.E. Miller, E. Valencia. 2015. Effects of plant tannin extracts supplementation on animal performance and gastrointestinal parasites infestation in steers grazing winter wheat. *Open Journal of Animal Sciences*, 5: 343-50.
30. Mohammadabadi, T., M. Gheibipour, H. Motamedi, M. Chaji and B.A. Abbas. 2021. Isolation and identification of tannin-degrading bacteria from deer gut and potency for improving nutritional value of tannin rich plants. *Iranian Veterinary Journal*, 17(1): 65-75 (In Persian).
31. Mohammadabadi, T., A. Jolazadeh and Z. Ghezi. 2020. Effect of treated *Conocarpus erectus* L. leaves with *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* as tannin-degrading bacteria on digestion activity of rumen microorganisms. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 36(1): 1-16.
32. Mokhtarpour, A., A. Naserian, R. Valizadeh, A. Tahmasbi. 2012. Effect of polyethylene glycol and urea treated pistachio by-products silage on phenolic compounds, *in vitro* gas production and Holstein dairy cow's performance. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 4(1): 55-62 (In Persian).
33. Molina, D.O., A.N. Pell and D.E. Hogue. 1999. Effects of ruminal inoculations with tannin tolerant bacteria on fibre and nitrogen digestibility of lambs fed a high condensed tannic diet. *Animal Feed Science and Technology*, 81: 69-80.
34. Muck, R.E., E.M.G. Nadeau, T.A. McAllister, F.E. Contreras-Govea, M.C. Santos and L. Kung. 2018. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5): 3980-4000.
35. Naumann, H.D., L.O. Tedeschi, W.E. Zeller and N.F. Huntley. 2017. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira De Zootecnia*, 46(12): 929-949.

36. NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants, sheep, goats, cervids, and camelids. Washington, DC: National Academy of Science, 384 pp.
37. Orskov E.R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Food Engineering*, 80: 1-10.
38. Orzuna-Orzuna, J.F., G. Dorantes-Iturbide, A. Lara-Bueno, G.D. Mendoza-Martínez, L.A. Miranda-Romero and P.A. Hernández-García. 2021. Effects of dietary tannins supplementation on growth performance, rumen fermentation, and enteric methane emissions in beef cattle: A Meta-Analysis. *Sustainability*, 13(13): 7410.
39. Patra, A.K. and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis the rumen. *Phytochemistry*, 71: 1198-1222.
40. Pellikaan, W.F., E. Stringano, J. Leenaars, D.J.G.M. Bongers, S.L. Schuppen, J. Plant and I. Mueller-Harvey. 2011. Evaluating effects of tannins on extent and rate of *in vitro* gas and CH<sub>4</sub> production using an automated pressure evaluation system (APES). *Animal Feed Science and Technology*, 166: 377-390.
41. Rojas-Sandoval, J. 2017. *Ziziphus spina-christi* (Christ's thorn jujube). *Invasive Species Compendium*. CABI, Wallingford, UK, DOI:10.1079/ISC.57569.20203483212
42. Saha, S.S. and M. Ghosh. 2019. Comparative study of antioxidant activity of [alpha]-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10): 2551-2556.
43. Santos, W.P., C.L.S. Ávila, M.N. Pereira, R.F. Schwan, N.M. Lopes and J.C. Pinto. 2017. Effect of the inoculation of sugarcane silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on feeding behavior and milk yield of dairy cows. *Journal of Animal Science*, 95: 4613-4622.
44. Setiarto, R.H.B. and N. Widhyastuti. 2016. Effect of lactic acid bacteria fermentation for physicochemical properties of modified yam flour (*Dioscorea hispida*). *Berita Biologi*, 15(2): 149-157.
45. Sharifi, A. and M. Chaji. 2019. Effect of recycled poultry bedding treated with phenolic compounds extracted from pomegranate peel on *in vitro* digestion activity of rumen microbes. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 29(5): 1491-1500.
46. Sharifi, A., M. Chaji and A. Vakili. 2019. Effect of treating recycled poultry bedding with tannin extracted from pomegranate peel on rumen fermentation parameters and cellulolytic bacterial population in Arabian fattening lambs. *Veterinary Research Forum*, 10(2): 145-152.
47. Sharma, D., G. Mal, A. Kannan, R. Bhar, R. Sharma and B. Singh. 2017. Degradation of euptox A by tannase-producing rumen bacteria from migratory goats. *Journal of Applied Microbiology*, 123(5): 1194-1202.
48. Tahmourespour, A., N. Tabatabaei, H. Khalkhali and I. Amini. 2016. Tannic acid degradation by *Klebsiella* strains isolated from goat feces. *Iranian Journal of Microbiology*, 8: 14.
49. Tiemann, T.T., C.E. Lascano, H.R. Wettstein, A.C. Mayer, M. Kreuzer and H.D. Hess. 2008. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. *Journal Animal*, 2: 790-799.
50. Tilley, J.M.A. and R.A. Terry. 1963. A two stage technique for the in digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*, 18: 104-111.
51. Van Soest, P.J., J.B. Roberson and B.A. Lewis. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10): 3583-3597.
52. Yanez Ruiz, D.R., A. Moumen, A.I. Martin-Garcia, E. Molina Alcaide. 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: effect of PEG supply. *Journal of Animal Science*, 82: 2023-2032.
53. Yarahmadi, Y., M. Chaji, M. Boujarpour, K. Mirzadeh and M. Rezaei. 2017. Effects of sainfoin tannin treated by water or urea on microbial population, gas production parameters, digestibility and *in vitro* fermentation. *Iranian Veterinary Journal*, 13(3): 97-114.
54. Zhang, J., X. Xu, Z. Cao, Y. Wang, H. Yang, A. Azarfar and S. Li. 2019. Effect of different tannin sources on nutrient intake, digestibility, performance, nitrogen utilization, and blood parameters in dairy cows. *Animals*, 9: 507.

## Improving the Nutritional Value of *Ziziphus Spina-Christi* using Degrading Bacteria Isolated from the Rumen

Zahra Jahanara<sup>1</sup> and Morteza Chaji<sup>2</sup>

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran  
 2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran,  
 (Corresponding author: chaji@asnruk.ac.ir)  
 Received: 11 March, 2022 Accepted: 18 April, 2022

### Extended Abstract

**Introduction and Objective:** Tannins have many limiting effects on consumption, nutrient digestion, growth and performance, palatability. There are many plants and by-products that are limited in animal feed due to the high content of anti-nutritional compounds such as tannins. The use of methods that can reduce the amount of these compounds will allow their use in animal feed. The aim of the present experiment was to improve the nutritional value of *Ziziphus Spina-Christi*, which contains tannins and polyphenolic compounds for ruminants.

**Material and Methods:** *Ziziphus Spina-Christi* leaves were treated with four tannin degrading bacteria including *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter spp.* (isolated from deer rumen), *Lactobacillus fermentum* (isolated from Najdi goat rumen), and *commercial Lactobacillus fermentum*. In two stages, chemical composition, digestibility, and fermentation of *Ziziphus Spina-Christi* leaves were studied alone or in combination in a standard diet of fattening lambs by laboratory methods. Experimental treatments in the first and second stages each consisted of 5 treatments, 1- *Ziziphus Spina-Christi* leaves or diets containing it without processing (control), 2- to 5- leaves or diets containing it, which were treated separately with each of the four bacteria.

**Results:** Gas production potential, gas production rate, truly degradable organic matter, microbial biomass production efficiency, ammonia nitrogen concentration, and protozoa population of *Ziziphus Spina-Christi* leaves treated with tannin-degrading bacteria increased significantly compared to the control ( $p < 0.05$ ). The percentage of dry matter digestibility, NDF, and ADF of the *Ziziphus Spina-Christi* leaves treated with tannin degrading bacteria also increased compared to the control ( $p < 0.05$ ). In the second phase of the experiment, gas production potential, dry matter, NDF, and ADF digestibility percentage, ammonia nitrogen concentration and protozoa population of fattening lamb diets containing processed *Ziziphus Spina-Christi* leaves were increased compared to the control ( $p < 0.05$ ). Gas production rate, partitioning factor (PF) coefficient, microbial biomass production, and microbial biomass production efficiency in diets containing processed *Ziziphus Spina-Christi* leaves increased compared to the control only numerically ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results of this study showed that considering the positive effects of *Ziziphus Spina-Christi* leaves processing with tannin-degrading bacteria, it could be said that processing this plant to reduce tannin is a suitable solution for better use of *Ziziphus Spina-Christi* leaves in the diet.

**Keywords:** Digestibility, Gas production potential, Microbial biomass production, Tanase enzyme, Tannin concentration