Animal Production Research

Vol. 12, No. 3, 2023 (29-47)
doi: 10.22124/AR.2023.25526.1790
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Potential of biochar in enhancing the effectiveness of probiotics Bacilli and Lactobacilli on *in vitro* microbial populations, hydrolytic enzymes, and ruminal fermentation in sheep

Z. Bagherpoor[1], J. Rezaei[2]*, Y. Rouzbehan[3]

1. Former MSc Student of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: 10-09-2023 – Revised: 29-10-2023 – Accepted: 31-10-2023)

Introduction: Probiotics accelerate and improve rumen development, stability, and balance of beneficial microbes in the digestive system and decrease microflora disruption, which will increase the activity of desirable enzymes. This action of probiotics increases digestibility, feed efficiency, livestock performance, and general defense including antioxidant power. However, the response of different animals to the specific probiotics is not uniform and similar. Therefore, it is necessary to provide factors that improve the conditions for the establishment and functioning of microbial additives in the rumen or to use compounds that have a synergistic effect with probiotics to receive a uniform and reassuring response from the herd. One of the potentially useful materials to achieve this goal is biochar. In the present study, it was hypothesized that if biochar (as a favorable habitat for microorganisms) is added to probiotic-containing diets, the conditions for establishing these microbial products in the fermentation environment may be improved and probiotics can act more efficiently. Moreover, a probable synergy between probiotics and biochar may increase the efficiency of these additives compared to their separate usage. However, there is no special information available in this regard, especially about the effect of including biochar in probiotic-containing diets on different microbial populations and rumen hydrolytic enzymes. Therefore, this study aimed to investigate the potential of biochar in enhancing the effectiveness of the probiotic sources (Bacilli and/or Lactobacilli) on microbial populations, hydrolytic enzyme activity, digestibility, antioxidant capacity, and fermentation products in the sheep rumen, *in vitro*.

Materials and methods: The experimental treatments were: 1. A basal diet without probiotics and biochar (control), 2. Basal diet containing probiotic Bacilli (*B. coagulans*, *B. subtilis,* and *B. licheniformis*, at the ratio of 2×10^{11}, 5×10^{9}, and 5×10^{9} CFU/g, respectively), 3. A basal diet containing probiotic Lactobacilli (*L. plantarum*, *L. rhamnosus,* and *Enterococcus faecium*, at the ratio of 2×10^{9}, 2×10^{10}, and 2×10^{10} CFU/g, respectively), 4. A basal diet containing biochar, 5. A basal diet containing Bacilli-biochar, 6. A basal diet containing Lactobacilli-biochar, and 7. A basal diet containing Bacilli-Lactobacilli-biochar. Diet digestibility was determined by the two-stage Tilley and Terry method. In addition, the 24 and 72-h *in vitro* gas production techniques were conducted. At the end of each incubation, cellulolytic and proteolytic bacteria, as well as protozoa population, enzymatic activity (carboxymethyl cellulose, microcrystalline cellulose, filter paper degrading, and α-amylase), truly digestible substrate (TDS), partitioning factor (PF), microbial biomass production (MBP), methane release, antioxidant capacity, pH, ammonia-N (NH_3-N), and volatile fatty acids (VFA) were determined by the standard methods. All *in vitro* tests were done in three replicates and two batches (runs) in different weeks. Data were analyzed in a completely randomized design using the GLM procedure of SAS.

* Corresponding author: rezaei.j@modares.ac.ir

CC BY

Results and discussion: Separate inclusion of probiotic Bacilli and biochar in the diet increased the cellulolytic bacteria population and activity of fibrolytic enzymes compared to the control (P<0.05), but these variables were not affected by Lactobacilli. The highest values of these variables were observed with the inclusion of biochar in probiotic Bacilli-containing diets (i.e., Bacilli-biochar and Bacilli-Lactobacilli-biochar treatments). These results were due to probiotics' ability to provide superior growth conditions for useful ruminal microbes, as well as the positive influence of the biochar structure, as a desirable habitat, on establishing, attaching, and developing rumen microorganisms. The protozoa population was not affected by biochar, but it was decreased (P<0.05) in the probiotic-containing diets (Bacilli and Lactobacilli treatments without or with biochar) in comparison to the control. The number of proteolytic bacteria and protease activity were not affected by the experimental treatments. Alpha-amylase activity in 24-h incubation in Basilli and Lactobacilli treatments was higher than the control (P<0.05) but was not affected by biochar. The activity of this enzyme in 72-incubation was lower in the control than in probiotic or biochar treatments (P<0.05). The alpha-amylase activity was the highest in the Lactobacilli-biochar and Bacilli-Lactobacilli-biochar groups. Separate inclusion of probiotics and biochar in the diet increased the diet digestibility, degraded substrate, and microbial biomass production (P<0.05). The maximum values of these parameters were detected in the probiotics-biochar diets. The reason for these increases can be related to the improvement of the cellulolytic bacteria population, alpha-amylase, and fibrolytic enzyme activity in the probiotic or biochar groups. The 24-h total antioxidant activity was not affected by the treatments. In 72-h incubation, the probiotics did not affect this variable, but a tendency to increase in antioxidant capacity was observed in diets containing biochar (without or with probiotics). The improving effect of biochar on the antioxidant power could be owing to its activity in trapping pollutants, poisons, and adverse factors in the incubation medium. Methane release, NH_3-N, and acetate to propionate ratio were decreased, but total VFA was increased by separate use of the probiotics or biochar in the diet, compared to the control (P<0.05). More importantly, the inclusion of biochar in the diets containing the probiotic (i.e., Bacilli-biochar, Lactobacilli-biochar, and Bacilli-Lactobacilli-biochar) resulted in the greatest total VFA and the lowest NH_3-N and methane release (P<0.05). One reason for the increased methane and ammonia was the lower protozoa population in the additives groups. The methane decline may also be related to the decreasing effect of the additives on methanogens, and their increasing effect on methanotrophs. Moreover, the improved bacterial biomass production could be considered as another reason for the decreased ammonia; i.e., more ammonia was assimilated into the bacterial protein. The increased VFA production was due to the higher digestibility and degraded substrate in the probiotic and/or biochar groups. Regarding the valuable characteristics of probiotics and biochar and their probable synergistic effects, their simultaneous application resulted in the highest improvement of fermentation variables.
Conclusions: Separate use of probiotics Bacilli and Lactobacilli or biochar in the diet improved *in vitro* ruminal microbial and enzymatic activity and reduced energy (as methane) and nitrogen (as ammonia) losses. More importantly, the addition of biochar to the probiotics-containing diets was a suitable strategy for enhancing the effectiveness of the probiotic sources on digestibility and microbial biomass and reduction of methane and ammonia. However, these results need to be confirmed by further experiments.
Keywords: Bacilli, Biochar, Rumen, Enzymatic-microbial activity, Lactobacilli
Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.
Funding: The authors received financial support from Tarbiat Modares University and different companies which are mentioned in the materials and methods section of this manuscript.
Acknowledgments: The authors would like to acknowledge Tarbiat Modares University and different companies which are mentioned in the materials and methods section of this manuscript for supporting this study.

How to cite this article:

Bagherpoor, Z., Rezaei, J., & Rouzbehan, Y. (2023). Potential of biochar in enhancing the effectiveness of probiotics Bacilli and Lactobacilli on *in vitro* microbial populations, hydrolytic enzymes, and ruminal fermentation in sheep. *Animal Production Research*, *12*(3), 29-47. doi: 10.22124/AR.2023.25526.1790

تحقیقات تولیدات دامی

سال دوازدهم/شماره سوم/پاییز ۱۴۰۲ (۴۷-۲۹)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

توان بیوچار در تقویت اثرگذاری پروبیوتیک‌های باسیلی و لاکتوباسیلی بر جمعیت‌های میکروبی، آنزیم‌های هیدرولیتیک و تخمیر برون‌تنی شکمبه گوسفند

زهرا باقرپور[۱]، جواد رضائی[۲*]، یوسف روزبهان[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۹ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۰۷ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹)

چکیده

هدف این پژوهش، بررسی پتانسیل بیوچار در تقویت اثربخشی پروبیوتیک‌ها (باسیل/لاکتوباسیل) بر فعالیت‌های میکروبی-آنزیمی و تخمیر برون‌تنی شکمبه گوسفند بود. آزمایش با هفت تیمار شامل جیره فاقد پروبیوتیک و بیوچار (شاهد) و جیره‌های حاوی باسیل، لاکتوباسیل، بیوچار، باسیل-بیوچار، لاکتوباسیل-بیوچار و باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار انجام شد. جمعیت‌های باکتریایی و پروتوزوآیی، آنزیم‌های هیدرولیتیک، هضم‌پذیری، فراسنجه‌های تولید گاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فرآورده‌های تخمیر طی انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته تعیین شدند. مصرف جداگانه پروبیوتیک‌ها و بیوچار موجب افزایش هضم‌پذیری، سوبسترای تجزیه‌شده، اسیدهای چرب فرار و توده میکروبی شد ($P<۰/۰۵$)، اما باکتری‌های پروتئولیتیک، پروتئاز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی تغییر نکرد. باکتری‌های سلولولیتیک و آنزیم‌های فیبرولیتیک در تیمارهای باسیل و بیوچار بیشتر از شاهد بود ($P<۰/۰۵$). همچنین، تعداد پروتوزوآها در گروه‌های باسیل و لاکتوباسیل کمتر از شاهد بود ($P<۰/۰۵$). آلفاآمیلاز در انکوباسیون ۲۴ ساعته در تیمارهای باسیل و لاکتوباسیل افزایش یافت ($P<۰/۰۵$)، اما تحت تأثیر بیوچار قرار نگرفت. در زمان ۷۲، آلفاآمیلاز در شاهد کمتر از تیمارهای پروبیوتیکی و بیوچار بود ($P<۰/۰۵$). متان، آمونیاک و نسبت استات:پروپیونات در تیمارهای پروبیوتیک و بیوچار در مقایسه با شاهد کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). گنجاندن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی (باسیل-بیوچار، لاکتوباسیل-بیوچار و باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار)، هضم‌پذیری، سوبسترای تجزیه شده، توده میکروبی، اسیدهای چرب فرار و آنزیم‌های فیبرولیتیک را به بیشترین مقدار رساند، و کمترین آمونیاک و متان حاصل شد ($P<۰/۰۵$). بیشترین جمعیت سلولولیتیک‌ها در گروه‌های باسیل-بیوچار و باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار، و بیشترین آلفاآمیلاز در تیمارهای لاکتوباسیل-بیوچار و باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار مشاهده شد. درمجموع، افزودن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی به منظور تقویت تأثیر پروبیوتیک‌ها بر هضم و تولید توده میکروبی، و کاهش متان و آمونیاک قابل توصیه است، هرچند مطالعات بیشتری لازم است.

واژه‌های کلیدی: باسیل، بیوچار، شکمبه، فعالیت میکروبی-آنزیمی، لاکتوباسیل

* نویسندهٔ مسئول: rezaei.j@modares.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2023.25526.1790

مقدمه

یکی از اهداف مهم در تغذیه نشخوارکنندگان، افزایش پتانسیل تخمیر خوراک در شکمبه، بهبود هضم‌پذیری جیره، استفاده بهینه از منابع انرژی و پروتئین، و در عین حال، کاهش اتلاف منابع به شکل متان و آمونیاک است (Wu, 2018). یکی از راه‌کارهای تغذیه‌ای برای رسیدن به هدف بالا، بهبود جمعیت‌های مختلف میکروبی و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه با استفاده از افزودنی‌های خوراکی است. در این راستا، تلاش‌های زیادی با کاربرد انواع متفاوتی از افزودنی‌ها انجام می‌شود. این مواد ممکن است به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم بر تنوع میکروبی و فرآورده‌های تخمیری شکمبه اثر بگذارند. آنتی‌بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، الیگوساکاریدها، اسیدهای آلی و ترکیبات تغییردهنده و کنترل‌کننده تخمیر شکمبه از جمله این افزودنی‌ها هستند (Wu, 2018; McDonald *et al.,* 2022). با توجه به محدودیت‌های وضع شده و نگرانی‌های ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، کاربرد سایر افزودنی‌های خوراکی رو به افزایش است که از جمله می‌توان به پروبیوتیک‌ها اشاره کرد. تحقیقات زیادی در زمینه مصرف منابع پروبیوتیکی در تغذیه دام انجام شده است. افزودنی‌های میکروبی موجب تسریع و بهبود توسعه شکمبه، ثبات و تعادل مطلوب در جمعیت میکروب‌های مفید دستگاه گوارش و جلوگیری از اختلال در فلور میکروبی می‌شوند که این موارد، افزایش فعالیت آنزیم‌های مفید دستگاه گوارش را به دنبال خواهد داشت (Di Gioia and Biavati, 2018; McDonald *et al.,* 2022). این عملکرد پروبیوتیک‌ها موجب افزایش قابلیت هضم و بازده خوراک، بهبود عملکرد دام و نیز تقویت دفاع عمومی بدن و از جمله دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Di Gioia and Biavati, 2018; McDonald *et al.,* 2022; Radzikowski, 2017). به هر حال، شدت پاسخ دام‌های مختلف به پروبیوتیک‌ها، بر اساس نوع افزودنی میکروبی، شیوه استفاده، نوع و عملکرد دام، وجود یا عدم وجود عوامل تنش‌زا، اجزا و ترکیب شیمیایی جیره، نوع سامانه پرورش دام، محیط، و برهم‌کنش ناشی از مواد تشکیل‌دهنده جیره متفاوت است (Di Gioia and Biavati, 2018). بنابراین، ممکن است در برخی شرایط، پاسخ بهینه مورد انتظار از مصرف یک فرآورده پروبیوتیکی حاصل نشود. بر این اساس، باید راه‌کارهایی فراهم نمود که افزودنی‌های میکروبی، شرایط استقرار و عملکرد بهینه در دستگاه گوارش (از جمله در شکمبه) را داشته باشند و تأثیر مثبت خود را به بهترین شکل نشان دهند. بدین منظور می‌توان از عوامل مساعدکننده شرایط رشد پروبیوتیکی و یا از ترکیبات دارای اثر هم‌کوشی با پروبیوتیک‌ها استفاده کرد تا پاسخ یکنواخت‌تر و اطمینان‌بخش‌تری از گله دریافت شود. بیوچار یکی از مواد بالقوه سودمند برای نیل به این هدف است.

همانند پروبیوتیک‌ها، امروزه در زمینه کاربرد بیوچار در صنایع مختلف و از جمله تغذیه دام، تحقیقات خوب و متنوعی انجام شده است. این ماده از گرماکافت ضایعات کشاورزی در دمای ۲۰۰ تا ۹۰۰ درجه سیلسیوس، در محیطی بدون اکسیژن یا با اکسیژن بسیار محدود تولید می‌شود و در بهبود عملکرد دام و نیز به عنوان یک عامل سم‌زدا در جیره کاربرد دارد (Prasai *et al.,* 2016). برخی از مواد اولیه تولید بیوچار به آسانی قابل دسترس هستند، که از این بین می‌توان به شاخه و برگ ناشی از هرس درختان اشاره کرد که غالباً در طبیعت رها می‌شوند یا سوزانده می‌شوند و مصرف مهمی ندارند. این منابع غیرخوراکی دارای قابلیت خوبی برای مصارف غیرتغذیه‌ای هستند که از جمله می‌توان تبدیل آن‌ها به بیوچار را نام برد. ناحیه سطحی وسیع و وجود منافذ فراوان و بسیار ریز در بیوچار، اهمیت زیادی در جذب مواد آلی و گازها دارد. ساختار ویژه بیوچار قادر است محیط بسیار مطلوبی را برای استقرار میکروارگانیسم‌های شکمبه ایجاد نماید و می‌تواند باعث شود دسترسی سوبسترا برای تجزیه و میزان اتصال میکروب-خوراک و آنزیم-خوراک بهتر رخ دهد. چنین شرایطی ممکن است تعادل و ثبات بهینه جمعیت‌های میکروبی مفید، رشد بهتر میکروارگانیسم‌ها و بهبود بازده تخمیر را به دنبال داشته باشد. همچنین، کاهش اتلاف منابع انرژی و نیتروژن حاصل خواهد شد (Di Gioia and Biavati, 2018; Teoh *et al.,* 2019). بیوچار با پیوند نمودن سموم موجود در جیره و نیز سموم و عوامل ناخواسته موجود در محیط تخمیر قادر به فراهم کردن شرایط بهتر برای میکروب‌ها و دام میزبان است و باعث افزایش قابلیت هضم جیره می‌شود (Rashidi *et al.,* 2018). در تحقیقات مختلف، کاربرد بیوچار موجب بهبود عملکرد و سلامت دام‌های مختلف از جمله گوساله (Sirjani *et al.,* 2023)، گاو گوشتی (Saroeun *et al.,* 2018) و گوسفند

(Mirheidari *et al.,* 2018a,b) شده است. اگرچه اطلاعات زیاد و جامع در دسترس نیست اما مصرف بیوچار، در برخی آزمایش‌ها، میزان تولید پروتئین میکروبی و جمعیت باکتری‌های فیبرولیتیک را بهبود داد و موجب کاهش تولید آمونیاک و متان شد (Leng *et al*., 2012; Mirheidari *et al.,* 2018b; Sirjani *et al.,* 2023).

با توجه به خصوصیات بیوچار به عنوان یک بستر مطلوب برای رشد میکروبی، در مطالعه حاضر چنین فرض شد که اگر بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی اضافه شود، ممکن است شرایط استقرار این فرآورده‌های میکروبی را در محیط تخمیر بهبود دهد و پروبیوتیک‌ها ضمن استقرار بهتر در شکمبه، با بازده بیشتری عمل نمایند و در واقع، تقویت عملکرد پروبیوتیکی در اثر بیوچار مشاهده شود. از سوی دیگر، هم‌کوشی بین منابع پروبیوتیکی و بیوچار ممکن است بازده این دو افزودنی را نسبت به مصرف جداگانه آن‌ها افزایش دهد. به هر حال، اطلاعات چندانی برای ارائه راه‌کار در این خصوص در دسترس نیست و به ویژه اطلاعات چندانی در زمینه اثر گنجاندن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی بر تغییر جمعیت‌های میکروبی و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه وجود ندارد. بر اساس مفروضات بالا، هدف از آزمایش حاضر، بررسی توان بیوچار در تقویت تأثیر پروبیوتیک‌ها (باسیل و لاکتوباسیل) بر جمعیت‌های میکروبی، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، آزادسازی متان و تخمیر شکمبه گوسفند در شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی و تیمارها: محصولات پروبیوتیکی از شرکت فرآورده‌های زیستی پردیس رشد (شیراز) خریداری شدند. افزودنی لاکتوباسیلی مخلوطی از گونه‌های *L. plantarum*، *L. rhamnosus* و *Enterococcus faecium* (به ترتیب با مقادیر ۲×۱۰^{۹}، ۲×۱۰^{۱۰}، ۲×۱۰^{۱۰} CFU در گرم)، و افزودنی باسیلی مخلوطی از گونه‌های *B. coagulans*، *B. subtilis* و *B. licheniformis* (به ترتیب با مقادیر ۲×۱۰^{۱۱}، ۵×۱۰^{۹}، ۵×۱۰^{۹} CFU در گرم) بودند. بیوچار مصرفی با حرارت‌دهی چوب ضایعاتی حاصل از هرس درختان انار و آلو در محیط بدون اکسیژن (دمای ۵۰۰ درجه سیلسیوس و به مدت سه ساعت) حاصل شد و فرآورده مذکور به وسیله شرکت فصل پنجم فرحبخش (شیراز) در اختیار قرار گرفت.

به منظور بررسی توان بیوچار در تقویت تأثیر پروبیوتیک‌ها بر متغیرهای مختلف، تیمارهای زیر مورد آزمایش قرار گرفتند: ۱- جیره پایه بدون افزودنی پروبیوتیکی و بیوچار (شاهد)، ۲- جیره پایه دارای پروبیوتیک باسیلی، ۳- جیره پایه دارای پروبیوتیک لاکتوباسیلی، ۴- جیره پایه دارای بیوچار، ۵- جیره پایه دارای مخلوط باسیل-بیوچار، ۶- جیره پایه دارای مخلوط لاکتوباسیل-بیوچار، و ۷- جیره پایه دارای مخلوط باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار. جیره پایه فاقد افزودنی‌های آزمایشی بر اساس جداول نیازهای غذایی دام‌های سبک (NRC, 2007) متوازن شد (جدول ۱). سایر تیمارها با گنجاندن افزودنی‌های مختلف در جیره پایه ایجاد شدند. میزان مصرف بیوچار و پروبیوتیک در جیره به ترتیب ۱۰ و یک گرم در کیلوگرم ماده خشک بود.

تعیین قابلیت هضم برون‌تنی: با توجه به آن‌که برخی افزودنی‌های خوراکی ضمن بهبود تخمیر و هضم، ممکن است موجب کاهش گاز تولیدی، و در نتیجه به اشتباه باعث کاهش برآورد قابلیت هضم و نتایج نادرست شوند، بنابراین در این آزمایش، به‌جای روش مبتنی بر گاز (آزمون تولید گاز)، از رویکرد مبتنی بر وزن‌سنجی نمونه و بقایای هضم‌نشده (یعنی روش هضم دومرحله‌ای) برای تعیین ضرایب هضمی استفاده شد (Tilley and Terry, 1963). مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم جیره (در سه تکرار) در داخل لوله‌های سانتریفیوژ قرار گرفت و آزمایش در دو سری (run) مجزا در هفته‌های متفاوت اجرا شد. پیش از خوراک‌دهی صبح، نسبت به جمع‌آوری و صاف‌کردن شیرابه شکمبه از سه رأس گوسفند بالغ فیستوله شده نژاد شال اقدام شد. جیره گوسفندان حاوی یونجه، کنجاله سویا، دانه جو، دانه ذرت، نمک و پیش‌مخلوط معدنی-ویتامینی به ترتیب با نسبت‌های ۶۰، ۵، ۱۸/۵، ۱۵، ۰/۵ و ۱ درصد ماده خشک بود. پس از تهیه بافر مک‌دوگال، شیرابه شکمبه و بافر به نسبت یک به چهار با هم مخلوط شدند. سپس، مقدار ۳۵ میلی‌لیتر مخلوط شیرابه-بافر به هر نمونه اضافه شد و محیط تخمیر به وسیله دی‌اکسید کربن بی‌هوازی شد. درب لوله‌ها (مجهز به روزنه خروج گاز) به خوبی بسته شد و تخمیر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۹ درجه سیلسیوس صورت گرفت. پس از آن، لوله‌ها سانتریفیوژ شدند و با دور ریختن مایع رویی، مرحله دوم هضم انجام شد.

جدول ۱- اجزای خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه

Table 1. Feed ingredients and chemical composition of the basal diet[1]

Ingredient (g/100 g DM)		Chemical composition (g/100 g DM or as stated)	
Alfalfa hay	40.0	Crude protein	13.1
Wheat straw	10.0	Neutral detergent fiber	32.5
Barley grain	17.0	Acid detergent fiber	21.7
Corn grain	19.0	Ash	6.67
Wheat grain	6.0	Ether extract	2.48
Soybean meal	6.0	Non-fiber carbohydrates	45.3
Mineral-vitamin premix[2]	1.0	Metabolizable energy (MJ/kg DM)	10.26

[1] The treatments were i. Basal diet free of probiotics and biochar (control) and diets containing ii. Probiotic Bacilli (BAC: a mixture of *B. coagulans*, *B. subtilis,* and *B. licheniformis*, at the ratio of 2×10^{11}, 5×10^{9}, and 5×10^{9} CFU/g, respectively), iii. Probiotic Lactobacilli (LAC: a mixture of *L. plantarum*, *L. rhamnosus,* and *Enterococcus faecium*, at the ratio of 2×10^{9}, 2×10^{10} and 2×10^{10} CFU/g, respectively), iv. Biochar (BIO; obtained from pomegranate and plum woods), v. Probiotic Bacilli and biochar (BAC-BIO), vi. Probiotic Lactobacilli and biochar (LAC-BIO), and vii. Bacilli, Lactobacilli and biochar (BAC-LAC-BIO).

[2] Mineral premix contained (per kg): 120 g of Ca, 30 g of P, 60 g of Mg, 4 mg of Se, 40 mg of Co, 70 mg of Mn, 100 mg of I, and 30 mg of Cu, 500,000 IU of vitamin A, 100,000 IU of vitamin D3, and 8,000 IU of vitamin E.

بدین منظور، در هر لوله، ۳۵ میلی‌لیتر پپسین اسیدی اضافه شد و انکوباسیون ۴۸ ساعته دوم اجرا شد. با پایان یافتن ۴۸ ساعت، محتویات هر لوله با کاغذ صافی و پمپ خلأ صاف شد. سپس، بقایای هضم نشده با استفاده از آون خشک و توزین شدند. در نهایت، مواد حاصل در کوره الکتریکی سوزانده شد و مقادیر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز با استفاده از روابط زیر برآورد شد (AFRC, 1993):

DMD (%) = [(Initial DM weight - Final DM weight)/Initial DM weight] × 100

OMD (%) = [(Initial OM weight - Final OM weight)/Initial OM weight] × 100

DOMD (%) = OMD × %OM

ME (MJ/kg DM) = 0.0157 × DOMD (g/kg DM)

در روابط بالا، DMD، OMD، DOMD و ME به ترتیب معرف قابلیت هضم ماده خشک، قابلیت هضم ماده آلی، ماده آلی قابل هضم در ماده خشک و انرژی قابل سوخت‌وساز هستند.

آزمون گاز برون‌تنی و بررسی متغیرهای تخمیر: به منظور مقایسه اثر تیمارها در ۲۴ ساعت ابتدایی تخمیر و نیز در تخمیر بلندمدت، آزمون‌های تولید گاز در دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت (در سه تکرار و دو سری) اجرا شدند. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه در سرنگ‌های شیشه‌ای ویژه ریخته شد. شیرابه شکمبه، همانند بخش بالا، از سه رأس گوسفند جمع‌آوری، و با چهار لایه پارچه متقال صاف شد. حجم‌های مشخص آب مقطر، بافر، ماکرومینرال، میکرومینرال و رزازورین برای تهیه بزاق مصنوعی با هم مخلوط شدند و در دمای ۳۹ درجه سیلسیوس قرار گرفتند. ضمن برقرار جریان دی‌اکسید کربن، محلول احیاکننده افزوده شد تا شرایط احیا برقرار شود. سپس، شیرابه شکمبه-بزاق مصنوعی با نسبت ۱ به ۲ مخلوط شدند و مقدار ۳۰ میلی‌لیتر این مخلوط به داخل هر سرنگ تزریق شد. نمونه‌ها در دمای ۳۹ درجه سیلسیوس قرار داده شدند و در پایان، حجم کل گاز تولیدی برای انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته ثبت شد (Menke *et al.,* 1979).

برای تعیین جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک، از پنج میلی‌لیتر محتویات تخمیری هر سرنگ استفاده شد. محیط کشت بی‌هوازی مایع در داخل لوله‌های هانگیت (Hungate) ریخته شد و اتوکلاو شد. منبع کربوهیدراته (الیاف) مورد استفاده، کاغذ صافی واتمن شماره ۱ بود. بدین منظور، رقت‌های مختلف شیرابه در لوله‌های هانگیت تزریق شد و انکوباسیون به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۹ درجه سیلسیوس صورت گرفت. در نهایت، جمعیت کل باکتری‌های سلولولیتیک با توجه به شکست و تجزیه کاغذ صافی در تیمارهای مختلف تعیین شد که شکست و تجزیه کاغذ نشانه رشد باکتری‌های مذکور و تخمینی از تعداد آنها است (Dehority, 2003). شمارش کل باکتری‌های پروتئولیتیک، نیز مانند سلولولیتیک‌ها، در لوله‌های هانگیت حاوی محیط کشت مایع ویژه پروتئولیتیک‌ها، و با استفاده از ژلاتین به عنوان منبع غذایی صورت پذیرفت. جداسازی و شمارش لوله‌های مثبت و منفی از روی تجزیه و تغییر حالت ژلاتین مشخص شد. در واقع، جمعیت‌های باکتریایی از روی تعداد لوله با محتویات تجزیه‌شده تعیین می‌شود و برآورد جمعیت میکروبی با مراجعه به جداول ویژه "محتمل‌ترین عدد" (MPN) صورت می‌گیرد. برای تعیین جمعیت پروتوزوآیی، نسبت مناسب از شیرابه با فرمال‌سالین مخلوط شده و در

یخچال ذخیره شد. تعداد گروه‌های مختلف و جمعیت کل پروتوزوآ در هر نمونه به وسیله لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری شمارش شد (Dehority, 2003). تعداد پروتوزوآها بر اساس روش "محتمل‌ترین عدد" (یعنی بیشترین فراوانی مشاهده شده در نه مربع بزرگ لام) به‌دست آمد و اعداد به‌صورت لگاریتمی بیان شدند.

به منظور برآورد فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک، در ابتدا محتویات تخمیری هر سرنگ به ظرف ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شدند. سپس، پنج میلی‌لیتر محلول لیزوزیم و پنج میلی‌لیتر تتراکلرید کربن وارد شد و سه ساعت انکوباسیون در دمای ۳۹ درجه سیلسیوس انجام شد. پس از متوقف کردن واکنش با قرار دادن ظرف روی یخ، عمل سونیکاسیون (۵۰ میلی‌ولت به مدت شش دقیقه) صورت گرفت. آن‌گاه هر نمونه در ۲۷،۰۰۰ g (چهار درجه سیلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه) سانتریفیوژ شد و لایه رویی برای بررسی آنزیمی برداشته شد. فعالیت آنزیم‌های کربوکسی‌متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی، آلفاآمیلاز و پروتئاز در مایع رویی برداشت شده با استفاده از روش‌های استاندارد (Agarwal *et al.,* 2002; Makkar, 2010) تعیین شد. به ترتیب از کربوکسی‌متیل سلولز، میکروکریستالین سلولز، کاغذ صافی واتمن، نشاسته و کازئین به عنوان سوبستراهای هدف برای سنجش فعالیت آنزیم‌های بالا استفاده شد. هر نمونه شیرابه فرآوری شده (یعنی مایع رویی نهایی) به همراه معرف سنجش (مخلوط‌های بافری-سوبسترا) در دما و زمان استاندارد بر اساس نوع آنزیم انکوبه شدند، که این انکوباسیون موجب تغییر رنگ محیط واکنش می‌شود و نشانه فعالیت تجزیه سوبسترا است. در نهایت، فعالیت هر یک از آنزیم‌ها از روی میزان آزادسازی گلوکز و یا پروتئین به ازای هر واحد سوبسترای اولیه با توجه به تغییر رنگ محلول‌های آزمایشی و قرائت عدد جذب با روش نورسنجی در طول موج‌های معین برآورد شد.

برای به‌دست آوردن مقدار سوبسترای تجزیه شده حقیقی (TDS)، محتویات هر سرنگ در پایان زمان تخمیر، به همراه محلول شوینده خنثی بر اساس روش استاندارد برای یک ساعت جوشانده شد. سپس، فیلتراسیون صورت گرفت. بقایا در آون خشک شدند و سپس، سوزاندن بقایا در کوره الکتریکی انجام پذیرفت. مقدار سوبسترای تجزیه شده حقیقی با کسرکردن وزن نمونه اولیه و نهایی به‌دست آمد.

تخمین عامل تفکیک (PF) با تقسیم نمودن سوبسترای تجزیه شده حقیقی (میلی‌گرم) بر حجم گاز (میلی‌لیتر) حاصل شد. برای برآورد تولید توده میکروبی، مقدار سوبسترای تجزیه شده حقیقی منهای حجم گاز شده و در عدد ۲/۲ (ضریب ثابت استوکیومتری) ضرب شد (Makkar, 2010). روابط مورد استفاده برای محاسبات به‌صورت زیر بود:

Truly degraded substrate (TDS; %) = [(Initail sample weight – Residual weight after incubation, treating with NDS and ashing)/ Initail sample weight] × 100

Partitioning factor (PF) = mg TDS/ mL gas production

Microbial bimass production (MBP) = TDS – (GP × 2.2)

متغیر بررسی‌شده دیگر، متان تولیدی در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته بود. برای برآورد آن، آزمون گاز همانند قبل انجام گرفت. حجم کل گاز در انتهای زمان‌های مذکور ثبت شد. سپس، چهار میلی‌لیتر سود ۱۰ مولار (به منظور جذب دی‌اکسید کربن) به سرنگ وارد و مخلوط شد. پس از تغییر حجم پیستون، عدد جدید ثبت شد که تقریباً معادل متان خواهد بود زیرا اندکی هیدروژن نیز همراه آن است (Anele *et al.,* 2011). اثر تیمارها بر ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی محیط تخمیر مطابق با روش FRAP (توان شیرابه در احیای یون‌های فریک به فرو در حضور معرف تری‌پیریدیل تیرازین) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد (Benzie and Strain, 1996).

میزان pH محیط تخمیر در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته به وسیله pHمتر دیجیتال ثبت شد. سپس، پنج میلی‌لیتر شیرابه با ۰/۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۵۰ درصد مخلوط و به‌صورت منجمد ذخیره شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی نمونه‌های مذکور با استفاده از روش فنل-هیپوکلرایت و نورسنجی (دستگاه میکروپلیت‌ریدر) تعیین شد (Galyean, 2010). برای سنجش غلظت اسیدهای استیک، پروپیونیک، ایزوبوتیریک، بوتیریک، ایزووالریک و والریک از دستگاه گازکروماتوگراف (UNICAM 4600, SB Analytical, UK)، مجهز به ستون کپیلاری (Agilent J&W HP-FFAP, 10 m × 0.535 mm × 1.00 µm, 19095F-121, USA)، استفاده شد (Galyean, 2010) و اسید ۲-اتیل بوتیریک به عنوان استاندارد داخلی بود.

تجزیه آماری داده‌ها: یافته‌های به‌دست‌آمده با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS (ویرایش ۹/۱)، در قالب طرح کاملاً تصادفی با مدل آماری زیر تجزیه شدند:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + B(T)_{ij} + e_{ijk} + e_{ijkl}$$

مدل دربرگیرنده Y_{ijkl} به عنوان مقدار هر مشاهده، μ، میانگین، T_i، اثر ثابت تیمار، $B(T)_{ij}$، اثر تصادفی سری در تیمار، e_{ijk}، خطای آزمایشی و e_{ijkl} نیز خطای نمونه‌برداری بود. از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح معنی‌داری پنج درصد برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک، باکتری‌های پروتئولیتیک و گروه‌های پروتوزوآیی: بر اساس اطلاعات جدول ۲، کاربرد پروبیوتیک مخلوط باسیلی موجب افزایش جمعیت کل باکتری‌های سلولولیتیک در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته نسبت به شاهد شد ($P<۰/۰۵$). جمعیت سلولولیتیک‌ها در تیمار لاکتوباسیل در انکوباسیون ۲۴ ساعته با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت، اما با گذشت ۷۲ ساعت از انکوباسیون، در مقایسه با شاهد بیشتر شد. بیوچار نیز اثر مثبتی بر جمعیت سلولولیتیک‌ها داشت ($P<۰/۰۵$). بیشترین جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک در تیمارهای باسیل-بیوچار و باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار مشاهده شد که نشان می‌دهد افزودن بیوچار به جیره پروبیوتیکی موجب تقویت اثر پروبیوتیک‌های مذکور در استقرار گروه‌های سلولولیتیکی شده است. بر اساس یافته‌های موجود، جنس‌ها و گونه‌های مختلف پروبیوتیکی، آثار مشابهی بر میکروارگانیسم‌های شکمبه ندارند و به‌طور اختصاصی بر برخی گروه‌های میکروبی خاص عمل می‌کنند (Rigobelo, 2012; Di Gioia and Biavati, 2018). از سوی دیگر، یافته‌های خاصی با موضوع اثر مصرف هم‌زمان پروبیوتیک-بیوچار بر جمعیت‌های میکروبی شکمبه منتشر نشده است. به هر حال، به نظر می‌رسد فرآورده میکروبی باسیلی (در مقایسه با لاکتوباسیل) در پژوهش حاضر شرایط بهتری را برای سلولولیتیک‌ها فراهم کرده باشد و این مشاهده هم‌سو با نتایج تحقیقی است که نشان داد یک گونه باسیلوس (*B. subtilis*) باعث افزایش باکتری‌های سلولولیتیک و میزان اتصال میکروب-غذا می‌شود (Manhar *et al*., 2016). در یک آزمایش برون‌تنی دیگر، مصرف پروبیوتیک‌های باسیلی موجب یک روند افزایشی در جمعیت سلولولیتیک‌ها شد، اما فرآورده لاکتوباسیلی سبب روند کاهشی در انکوباسیون ۲۴ ساعته شد (Ashkvari, 2019). در سایر آزمایش‌ها، افزایش باکتری‌های فیبرولیتیک با کاربرد مخلوط *L. acidophilus* و *S. cerevisiae* (Sheikh *et al*., 2022)، کاهش سلولولیتیک‌ها با مصرف *L. plantarum* و *B. subtilis* (Zhang *et al*., 2017) و عدم تغییر باکتری‌های سلولولیتیک در اثر گونه *B. subtilis* natto (Sun *et al*., 2013) نشان داده شد. علت این یافته‌های متناقض به گونه و سن حیوان، نوع میکروب مصرفی، دز مصرف، نوع آزمایش، شرایط محیطی، جیره و سطح تغذیه مربوط است (Le *et al.,* 2017; Sirjani *et al.,* 2023). از سوی دیگر، تأثیر مثبت بیوچار (به تنهایی یا در کنار پروبیوتیک‌ها) بر جمعیت سلولولیتیک‌های شکمبه‌ای را می‌توان به خلل و فرج فراوان و ناحیه سطحی بسیار گسترده آن مربوط دانست که باعث افزایش سطوح ساکن در شکمبه و بهبود زیستگاه میکروبی می‌شود (Leng *et al*., 2012). بنابراین، بهبود جمعیت فیبرولیتیک‌ها با مصرف مخلوط پروبیوتیک-بیوچار مشاهده شد.

بر خلاف سلولولیتیک‌ها، کاربرد منابع پروبیوتیکی، بیوچار و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار تأثیری بر جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک نداشت. اطلاعاتی در مورد اثر فرآورده‌های پروبیوتیکی پژوهش حاضر و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار بر این گروه باکتریایی وجود ندارد. به هر حال، در یک تحقیق، افزودن کربن زیستی به جیره تأثیری بر تعداد پروتئولیتیک‌ها نداشت (Saleem *et al.,* 2018). در یک آزمایش دیگر، مصرف باسیل و مخمر موجب یک روند افزایشی در جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک شد، بر لاکتوباسیل بی‌اثر بود، و مخلوط باسیل-مخمر و لاکتوباسیل-مخمر باعث افزایش باکتری‌های پروتئولیتیک شدند (Ashkvari, 2019). به‌علاوه، افزودن *B. subtilis* به جیره گاوهای هلشتاین، کل باکتری‌های شکمبه و جمعیت پروتئولیتیک‌ها را افزایش داد (Sun *et al.,* 2013). افزایش جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیکی با مصرف گونه *B. subtilis* در پژوهش دیگری نیز نشان داده شد (Manhar *et al.,* 2016).

جدول ۲- اثر جیره‌های حاوی پروبیوتیک، بیوچار و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار بر جمعیت‌های میکروبی (Log_{10}/mL digesta) شکمبه گوسفند در شرایط برون‌تنی

Table 2. Effect of diets containing probiotic, biochar, and probiotic-biochar mixture on microbial populations (Log_{10}/mL digesta) in sheep rumen, *in vitro*

Diet[1]	Bacteria		Protozoa				
	Cellulolytic	Proteolytic	Total	*Isotrichidae*	*Entodiniinae*	*Diplodiniinae*	*Ophryoscolecinae*
24-h incubation							
Control	8.889^{c}	8.946	5.94^{a}	5.00	5.82^{a}	4.87^{a}	4.32
BAC	8.943^{ab}	8.978	5.85^{b}	4.92	5.74^{b}	4.73^{b}	4.30
LAC	8.870^{c}	8.938	5.87^{b}	4.99	5.72^{b}	4.76^{b}	4.32
BIO	8.956^{ab}	8.962	5.91^{a}	4.98	5.79^{a}	4.78^{ab}	4.32
BAC-BIO	8.971^{a}	8.981	5.80^{c}	4.96	5.65^{c}	4.75^{b}	4.34
LAC-BIO	8.913^{b}	8.988	5.79^{c}	4.98	5.64^{c}	4.77^{ab}	4.32
BAC-LAC-BIO	8.975^{a}	8.985	5.77^{c}	4.93	5.61^{c}	4.82^{ab}	4.33
SEM[2]	0.023	0.029	0.016	0.042	0.020	0.054	0.026
P-value	0.003	0.34	<0.001	0.43	<0.001	0.021	0.88
72-h incubation							
Control	8.692^{c}	8.989	5.90^{a}	4.98	5.78^{a}	4.82^{a}	4.32
BAC	8.757^{ab}	8.941	5.77^{c}	4.90	5.64^{bc}	4.69^{bc}	4.32
LAC	8.747^{b}	8.936	5.80^{bc}	4.90	5.68^{bc}	4.67^{bc}	4.33
BIO	8.766^{ab}	9.001	5.88^{a}	4.91	5.75^{a}	4.77^{a}	4.28
BAC-BIO	8.781^{ab}	8.987	5.80^{bc}	4.91	5.69^{b}	4.73^{b}	4.29
LAC-BIO	8.764^{ab}	8.984	5.81^{b}	4.90	5.69^{b}	4.67^{bc}	4.32
BAC-LAC-BIO	8.801^{a}	8.971	5.81^{b}	4.92	5.70^{b}	4.64^{c}	4.30
SEM	0.018	0.035	0.023	0.034	0.029	0.053	0.023
P-value	0.002	0.14	<0.001	0.013	<0.001	0.030	0.61

[1] Control: Diet without probiotics and biochar; BAC: Diet containing Bacillali; LAC: Diet containing Lactobacilli; BIO: Diet containing biochar; BAC-BIO: Diet containing Bacillali and biochar; LAC-BIO: Diet containing Lactobacilli and biochar; BAC-LAC-BIO: Diet containing Bacillali, Lactobacilli and biochar.

[2] SEM: Standard error of the means. For 24 and 72-h incubations, the means in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت، جمعیت کل پروتوزوآ و گروه‌های *Entodiniinae* و *Diplodiniinae* در اثر مصرف پروبیوتیک و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار در مقایسه با شاهد، کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، اما مصرف بیوچار به تنهایی (جیره حاوی بیوچار بدون پروبیوتیک) فاقد تأثیر معنی‌دار بر جمعیت پروتوزوآیی بود. کمترین پروتوزوآ در انکوباسیون ۲۴ ساعته در گروه باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار، و در انکوباسیون ۷۲ ساعته در تیمار حاوی پروبیوتیک باسیلی مشاهده شد. افت نسبی جمعیت پروتوزوآیی اتفاق مثبتی است که سبب کاهش تجزیه پروتئین باکتریایی، افزایش پروتئین میکروبی و کاهش متان می‌شود. همچنین، کاهش پروتوزوآ موجب فراهم شدن یک زیستگاه امن‌تر برای باکتری‌ها و فرار باکتری از شکار به وسیله پروتوزوآ می‌شود (Millen *et al.,* 2016). همین موضوع شاید یکی دیگر از علل افزایش باکتری‌های سلولولیتیک در پژوهش حاضر باشد. کاهش پروتوزوآ در اثر مکمل‌های پروبیوتیکی پژوهش حاضر با نتایج دیگر محققان با مصرف مکمل *B. subtilis* (Sun *et al*., 2013)، باسیل‌ها و لاکتوباسیل‌ها (Ashkvari, 2019) موافق بود. روش تأثیر مکمل‌های پروبیوتیکی بر پروتوزوآی شکمبه مشخص نیست و نتایج تحقیقات متناقض است، اما مبحث اثر رابطه میکروب-میکروب و احتمال آثار غلبه یافتن یک گونه میکروبی یا فرآورده‌های آن بر سایر گونه‌ها ممکن است دلیل این اتفاق باشد (Millen *et al.,* 2016; Di Gioia and Biavati, 2018). برخی محققان یک علت احتمالی کاهش پروتوزوآ در اثر مصرف مکمل پروبیوتیکی را به میزان عرضه یون هیدروژن مربوط دانستند (Astuti *et al.,* 2022). آنها بیان کردند هنگامی که اسید پروپیونیک بیشتری تولید می‌شود، عرضه یون هیدروژن در شکمبه کاهش می‌یابد. در چنین شرایطی، رقبای مصرف‌کننده هیدروژن بر رشد پروتوزوآها و نیز رشد متانوژن‌ها تأثیر می‌گذارند و موجب کاهش این گروه‌های میکروبی می‌شوند. این توضیح با تغییرات غلظت پروپیونات در پژوهش حاضر نیز هم‌خوانی دارد. مخالف با این یافته‌ها،

برخی آزمایش‌ها، افزایش پروتوزوآ را در اثر مصرف مخلوط *L. acidophilus* و *S. cerevisiae* گزارش کردند (Sheikh *et al.*, 2022). درباره تأثیر تغذیه بیوچار به تنهایی نیز، موافق با تحقیق حاضر، کاربرد بیوچار پوست گردو و کود مرغی (Mirheidari *et al.*, 2019) و افزودن کربن زیستی (حاصل از تراشه‌های چوب کاج) به جیره (Saleem *et al.*, 2018) تأثیری بر پروتوزوآی شکمبه نداشت.

فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک: بر اساس نتایج جدول ۳، افزودنی پروبیوتیکی باسیلی موجب بهبود فعالیت آویسلاز و تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته، و بهبود فعالیت کربوکسی‌متیل سلولاز در زمان ۷۲ ساعت شد (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک در گروه لاکتوباسیل تفاوتی با شاهد نداشت. بیوچار به تنهایی موجب شد فعالیت آویسلاز و تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی در زمان ۲۴ ساعت، و فعالیت کربوکسی‌متیل سلولاز، آویسلاز و تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی در زمان ۷۲ ساعت نسبت به شاهد بیشتر باشد (P<۰/۰۵). بیشترین فعالیت مجموعه آنزیم‌های فیبرولیتیکی مربوط به جیره‌های پروبیوتیکی حاوی بیوچار (یعنی گروه‌های مخلوط باسیل-بیوچار و باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار) بود. مستندات خاصی درباره تأثیر پروبیوتیک‌ها و به ویژه بیوچار بر فعالیت آنزیم‌های شکمبه وجود ندارد. به هر حال، تأثیر مثبت مکمل باسیلوسی بر آنزیم‌های فیبرولیتیک در آزمایش حاضر تا حد زیادی می‌تواند به بهبود مشاهده شده در تعداد باکتری‌های سلولولیتیک مربوط باشد. همچنین، مشخص شده است که افزودنی میکروبی از یک گونه خاص قادر است سبب ایجاد ثبات و در نتیجه، استقرار بهتر برخی جمعیت‌های میکروبی در محیط گوارشی شود و احتمالاً افزایش فعالیت آنزیمی مربوط به آن جمعیت را به همراه داشته باشد (Radzikowski, 2017).

جدول ۳- اثر جیره‌های حاوی پروبیوتیک، بیوچار و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه گوسفند در شرایط برون‌تنی

Table 3. Effect of diets containing probiotic, biochar and probiotic-biochar mixture on hydrolytic enzymes activity in sheep rumen, *in vitro*

Diet[1]	CMCase[2]	Avicelase	FPD	α-Amylase	Protease
24-h incubation					
Control	3.54^{c}	2.00^{d}	2.40^{c}	12.05^{d}	0.819
BAC	3.67^{bc}	2.72^{bc}	3.11^{b}	13.53^{bc}	0.756
LAC	3.30^{c}	1.98^{d}	2.36^{c}	14.30^{ab}	0.814
BIO	3.71^{bc}	2.50^{c}	3.05^{b}	12.19^{cd}	0.779
BAC-BIO	3.91^{ab}	3.21^{a}	3.41^{a}	14.01^{ab}	0.749
LAC-BIO	3.74^{bc}	2.48^{c}	3.07^{b}	14.77^{ab}	0.787
BAC-LAC-BIO	4.31^{a}	3.01^{ab}	3.18^{b}	15.50^{a}	0.771
SEM[3]	0.077	0.017	0.078	0.584	0.062
P-value	0.011	<0.001	<0.001	<0.001	0.52
72-h incubation					
Control	2.84^{d}	1.93^{d}	4.47^{b}	9.57^{c}	0.592
BAC	3.27^{c}	2.78^{c}	4.74^{a}	10.76^{ab}	0.594
LAC	3.11^{c}	1.97^{d}	4.53^{b}	11.11^{ab}	0.563
BIO	3.50^{b}	3.30^{b}	4.89^{a}	10.10^{bc}	0.537
BAC-BIO	3.90^{a}	3.64^{a}	4.95^{a}	10.95^{bc}	0.580
LAC-BIO	3.64^{b}	3.34^{b}	4.88^{a}	11.73^{a}	0.595
BAC-LAC-BIO	4.07^{a}	3.62^{a}	5.04^{a}	11.34^{ab}	0.532
SEM	0.070	0.082	0.089	0.414	0.048
P-value	<0.001	<0.001	<0.001	0.018	0.29

[1] Control: Diet without probiotics and biochar; BAC: Diet containing Bacillali; LAC: Diet containing Lactobacilli; BIO: Diet containing biochar; BAC-BIO: Diet containing Bacillali and biochar; LAC-BIO: Diet containing Lactobacilli and biochar; BAC-LAC-BIO: Diet containing Bacillali, Lactobacilli and biochar.

[2] CMCase: Carboxymethyl cellulase (µmol glucose/mL per h); Avicelase: Microcrystalline cellulose (µmol glucose/mL per h); FPD: Filter paper degrading (µmol glucose/mL per h); α-Amylase as µmol glucose/mL per h; Protease as mg released protein/mL per h.

[3] SEM: Standard error of the means. For 24 and 72-h incubations, the means in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

در یک پژوهش دیگر، روند افزایشی در فعالیت آویسلاز و تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی با مصرف باسیل‌ها و مخمر، و نیز یک افزایش شدیدتر در فعالیت آویسلاز و تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی با مصرف مخلوط باسیل-مخمر گزارش شد (Ashkvari, 2019). از سوی دیگر، تأثیر مثبت بیوچار بر فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک در آزمایش حاضر به وجود خلل و فرج و ناحیه سطحی فراوان آن مربوط است که موجب می‌شود باکتری‌ها بهتر استقرار یابند و با بهبود دسترسی و میزان اتصال باکتری-سوبسترا (Leng *et al.*, 2013)، افزایش ترشح و فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک مشاهده شود. همین اثر بیوچار در تحقیق حاضر موجب شد تا بیشترین فعالیت فیبرولیتیکی در جیره‌های پروبیوتیکی حاوی بیوچار (یعنی گروه‌های مخلوط باسیل-بیوچار و باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار) مشاهده شود، که مفهوم آن، توان بیوچار در بهبود دادن شرایط توسعه و استقرار این پروبیوتیک باکتریایی در محیط شکمبه‌ای است.

با بررسی آلفاآمیلاز مشخص شد گنجاندن پروبیوتیک‌ها و بیوچار به‌طور مجزا و یا مخلوط آنها در جیره بر فعالیت آنزیم مذکور در هر دو زمان انکوباسیون مؤثر است ($P<۰/۰۵$)، اما تیمارهای باسیل، بیوچار و مخلوط باسیل-بیوچار در قیاس با تیمارهای لاکتوباسیل و لاکتوباسیل-بیوچار تأثیر کمتری بر بهبود فعالیت آلفاآمیلاز داشتند. این نتیجه با افزایش مشاهده شده در نسبت پروپیونات و کاهش استات شکمبه‌ای در جیره‌های حاوی لاکتوباسیل یا ترکیب لاکتوباسیل-بیوچار مطابقت دارد. افزایش قابل توجه فعالیت آلفاآمیلاز در گروه‌های حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلی به اثر شدیدتر این تیمارها در بهبود جمعیت باکتری‌های آمیلولیتیک و در نتیجه، افزایش فعالیت آمیلولیتیکی مربوط است.

بر خلاف آنزیم‌های بالا، فعالیت پروتئاز شکمبه‌ای در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته تحت اثر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. این نتیجه با عدم تغییر در جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک مطابقت دارد، زیرا بخش زیادی از فعالیت پروتئولیتیکی شکمبه مربوط به باکتری‌های مذکور است. همچنین، بخشی از فعالیت پروتئولیتیکی به پروتوزوآها ارتباط دارد (Dehority, 2003; Millen *et al.*, 2016)، که جمعیت آنها در اثر افزودنی‌های مصرف شده در این تحقیق کاهش یافت. بنابراین، عدم افزایش در فعالیت پروتئولیتیکی منطقی به نظر می‌رسد.

قابلیت هضم، تجزیه سوبسترا، توده میکروبی و عامل تفکیک: همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، منابع مختلف پروبیوتیک، بیوچار و ترکیب پروبیوتیک-بیوچار موجب افزایش ضرایب هضم ماده خشک و ماده آلی و انرژی قابل سوخت و ساز جیره‌ها در مقایسه با شاهد شدند ($P<۰/۰۵$) و بیشترین اعداد با گنجاندن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی (یعنی مخلوط پروبیوتیک-بیوچار) به‌دست آمد. چنانچه اشاره شد، پروبیوتیک‌ها شرایط بهتری را برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های مفید شکمبه‌ای فراهم می‌کنند (Di Gioia and Biavati, 2018). بیوچار نیز می‌تواند سبب جای‌گیری بهتر میکروبی و افزایش اتصال و رشد گونه‌های میکروبی (به‌ویژه سلولولیتیک‌ها) و در نتیجه، بهبود تجزیه مواد آلی شود (Mirheidari *et al.*, 2018b; Sirjani *et al.*, 2023). در پژوهش حاضر، این مزایا باعث شد جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک (جدول ۲) و فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز، آویسلاز و تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی (جدول ۳) برای گروه‌های پروبیوتیک یا بیوچار بیشتر از شاهد باشد و در نتیجه، بهبود هضم و انرژی مشاهده شد. از سوی دیگر، بیشترین افزایش در جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک و آنزیم‌های فیبرولیتیک مربوط به تیمارهای پروبیوتیک-بیوچار بود، که یک دلیل منطقی برای بیشینه بودن هضم و انرژی در این تیمارها در مقایسه با سایر گروه‌ها است. در واقع، یک هم‌افزایی بین اثر پروبیوتیک و بیوچار در آزمایش حاضر رخ داد و تأثیرگذاری این دو در کنار یکدیگر تقویت شد. مستندات خاصی در رابطه با اثر گنجاندن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی بر هضم و تخمیر در دسترس نیست، هر چند اثر مثبت پروبیوتیک‌های مختلف بر هضم جیره در تحقیقات زیادی اشاره شده است (Le *et al*., 2017; Ashkvari, 2019). به هر حال در برخی موارد، پروبیوتیک‌ها اثری بر قابلیت هضم خوراک نداشته‌اند (Soren *et al*., 2013). در مورد اثر مصرف بیوچار به تنهایی نیز گاه افزایش هضم (Mirheidari *et al.*, 2018b) و گاه عدم تأثیر بر قابلیت هضم جیره (Silivong and Preston, 2015) مشاهده شده است. مانند قبل، علت این تناقضات ممکن است به عواملی مانند نوع حیوان، نوع و دز افزودنی، محیط، جیره و سطح تغذیه مربوط باشد (Le *et al.*, 2017; Sirjani *et al.*, 2023).

بر اساس داده‌های جدول ۴، مقادیر سوبسترای تجزیه شده حقیقی، تولید توده میکروبی و عامل تفکیک در

انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته در اثر افزودنی‌های مختلف مصرفی در این تحقیق بهبود یافتند ($P<۰/۰۵$) و بیشترین مقادیر در جیره‌های پروبیوتیکی حاوی بیوچار (پروبیوتیک-بیوچار) مشاهده شد. برای بهبود سوبسترای تجزیه شده همان دلایل مرتبط با بهبود ضریب هضمی را می‌توان مطرح نمود، به‌طوری که افزایش جمعیت میکروب‌های سلولولیتیک و آنزیم‌های هیدرولیتیک موجب این بهبود شده است. البته باید توجه کرد که هر چند پروبیوتیک لاکتوباسیلی و ترکیب لاکتوباسیل-بیوچار در انکوباسیون ۲۴ ساعته تأثیر خاصی بر جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک نداشتند، اما موجب افزایش فعالیت آلفاآمیلاز شدند که در مجموع، موجب تغییرات مثبت در تجزیه سوبسترا شد.

تولید توده میکروبی در جیره‌های حاوی افزودنی‌های مختلف در مقایسه با جیره شاهد افزایش معنی‌داری یافت ($P<۰/۰۵$) و باز هم بیشترین اعداد با گنجاندن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی (پروبیوتیک-بیوچار) حاصل شد. بیشترین مقدار عامل تفکیک نیز مربوط به همین گروه‌ها بود. علت آن است که پروبیوتیک‌ها موجب افزایش فعالیت میکروب‌های مفید شکمبه‌ای و رقابت با گونه‌های نامطلوب و در نتیجه، باعث بهبود ساخت پروتئین و توده میکروبی از آمونیاک می‌شوند (Uyeno *et al*., 2015). بیوچار نیز زیستگاه مطلوبی را برای توسعه میکروبی ایجاد می‌کند (Mirheidari *et al.,* 2018b). یک دلیل مهم دیگر برای افزایش توده میکروبی در اثر افزودنی‌های تحقیق حاضر می‌تواند به کاهش یافتن جمعیت پروتوزوآیی (جدول ۲) مربوط باشد، زیرا موجب کاهش شکار باکتری‌ها و افت بازچرخ نیتروژن میکروبی در شکمبه می‌شود و در نتیجه، رشد توده باکتریایی را در پی خواهد داشت (Millen *et al.,* 2016).

جدول ۴- اثر جیره‌های حاوی پروبیوتیک، بیوچار و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار بر قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه گوسفند در شرایط برون‌تنی

Table 4. Effect of diets containing probiotic, biochar, and probiotic-biochar mixture on digestibility and fermentation parameters in sheep rumen, *in vitro*

Diet[1]	DMD[2]	OMD	ME	TDS	MBP	PF
24-h incubation						
Control	67.04^{d}	73.33^{e}	10.74^{d}	68.60^{c}	120^{d}	2.67^{e}
BAC	71.69^{bc}	77.12^{bc}	11.30^{b}	72.38^{ab}	166^{c}	2.86^{d}
LAC	71.21^{bc}	76.14^{cd}	11.15^{bc}	70.70^{b}	161^{c}	2.85^{d}
BIO	69.53^{c}	75.00^{d}	11.00^{c}	71.27^{ab}	233^{b}	3.27^{c}
BAC-BIO	72.18^{ab}	77.82^{ab}	11.39^{ab}	73.86^{a}	277^{a}	3.52^{b}
LAC-BIO	73.36^{a}	79.09^{a}	11.59^{a}	73.61^{a}	295^{a}	3.67^{a}
BAC-LAC-BIO	73.10^{a}	78.53^{a}	11.50^{a}	73.75^{a}	284^{a}	3.58^{ab}
SEM[3]	0.813	0.716	0.101	0.873	11.45	0.052
P-value	0.028	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
72-h incubation						
Control	-	-	-	75.00^{d}	60.6^{e}	2.39^{f}
BAC	-	-	-	81.86^{b}	151^{c}	2.70^{d}
LAC	-	-	-	79.82^{c}	121^{d}	2.59^{e}
BIO	-	-	-	80.53^{c}	228^{b}	3.07^{c}
BAC-BIO	-	-	-	83.08^{a}	283^{a}	3.34^{b}
LAC-BIO	-	-	-	82.61^{ab}	296^{a}	3.43^{a}
BAC-LAC-BIO	-	-	-	82.84^{ab}	279^{a}	3.32^{b}
SEM	-	-	-	0.755	8.82	0.029
P-value	-	-	-	<0.001	<0.001	<0.001

[1] Control: Diet without probiotics and biochar; BAC: Diet containing Bacillali; LAC: Diet containing Lactobacilli; BIO: Diet containing biochar; BAC-BIO: Diet containing Bacillali and biochar; LAC-BIO: Diet containing Lactobacilli and biochar; BAC-LAC-BIO: Diet containing Bacillali, Lactobacilli and biochar.

[2] DMD: Dry matter digestibility (%); OMD: Organic matter digestibility (%); ME: Metabolizable energy (MJ/kg DM); TDS: Truly degraded substrate (%); MBP: Microbial biomass production (mg/g DM); PF: Partitioning factor (mg TDS/mL gas produced).

[3] SEM: Standard error of the means. For 24 and 72-h incubations, the means in the same column with different superscripts differ ($P<0.05$).

بر اساس این تفاسیر، گنجاندن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی موجب یک اثر تقویتی شده و در نتیجه، استقرار و فعالیت میکروب‌های پروبیوتیکی احتمالاً بهتر شده که این اتفاق در نهایت باعث بیشترین بهبود در توده میکروبی در بین تیمارها شده است. این یافته با جمعیت زیادتر باکتری‌های سلولولیتیک و تعداد کمتر پروتوزوآ در این تیمارها (جدول ۲) هم‌خوانی دارد. درباره تأثیر مصرف همزمان پروبیوتیک-بیوچار مستندات خاصی در دسترس نیست، اما اثر مثبت مصرف مجزای پروبیوتیک و بیوچار بر تولید پروتئین میکروبی و توده میکروبی در برخی مطالعات اشاره شده است. برای مثال، در یک آزمایش، گونه‌های باسیلی، لاکتوباسیلی و مخمر تأثیری بر توده میکروبی در انکوباسیون ۲۴ ساعته نداشتند، اما موجب افزایش تولید توده میکروبی در انکوباسیون ۷۲ ساعته در قیاس با شاهد شدند (Ashkvari, 2019). در تحقیق دیگری، افزودن بیوچار به جیره موجب بهبود پروتئین میکروبی شد (Saleem *et al*., 2018).

عامل تفکیک شاخصی است که به‌صورت نسبت سوبسترای تجزیه شده حقیقی به حجم گاز تولیدی تعریف می‌شود و هر چه مقدار تولید گاز نسبت به سوبسترای تجزیه شده حقیقی کمتر باشد، نشان‌دهنده بازده بیشتر توده میکروبی است (Makkar, 2010). در پژوهش حاضر نیز تمامی افزودنی‌ها موجب افزایش عامل تفکیک شدند که نشان می‌دهد بخش بیشتری از ماده آلی تخمیر شده به سمت تولید توده میکروبی مسیردهی شده و سوبسترای کمتری به‌صورت آزادسازی گازها هدر رفته است، به‌طوری که تیمارهای با عامل تفکیک زیادتر دارای سوبسترای تجزیه‌شده بهتر و تولید گاز کمتر بودند. این نتایج نشان می‌دهد که بازده تولید میکروبی بهبود یافته است (Makkar, 2010).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فرآورده‌های تخمیری: جدول ۵ نشان می‌دهد که تیمارهای مختلف فاقد تأثیر معنی‌دار بر ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی در انکوباسیون ۲۴ ساعته بودند، اما در انکوباسیون ۷۲ ساعته، یک روند افزایشی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در تیمارهای حاوی بیوچار (به تنهایی و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار) در مقایسه با شاهد مشاهده شد (P=۰/۰۵۸). تیمارهای پروبیوتیک به تنهایی تفاوت خاصی با شاهد نداشتند. این مشاهدات نشان می‌دهد بیوچار عامل اصلی بهبوددهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوده و تأثیرش را پس از ۲۴ ساعت بروز داده است. علت را می‌توان به خاصیت جذب سموم و عوامل نامساعد محیط تخمیر به وسیله بیوچار نسبت داد (Rashidi *et al.,* 2018). اطلاعات چندانی در این خصوص در سایر تحقیقات مشاهده نشد. به هر حال، در یک آزمایش برون‌تنی، گنجاندن گونه‌های باسیل، لاکتوباسیل و مخمر در جیره، تغییری در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شکمبه‌ای ایجاد نکرد (Ashkvari, 2019)، که با عدم تأثیر پروبیوتیک‌ها در پژوهش حاضر موافق است. داده‌های تولید گاز نشان داد که کاربرد پروبیوتیک‌های باسیلی و لاکتوباسیلی به تنهایی موجب کاهش اندکی در کل تولید گاز نمونه‌ها شدند که از نظر آماری معنی‌دار نبود، اما تولید گاز ۲۴ و ۷۲ ساعته تمامی جیره‌های حاوی بیوچار (بیوچار، باسیل-بیوچار، لاکتوباسیل-بیوچار و باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار) در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P<۰/۰۵)، که مؤید اثر مثبت و اثبات شده بیوچار بر کاهش آزادسازی گاز از شکمبه به محیط است. علت عدم افزایش تولید گاز با مصرف پروبیوتیک‌ها (علی‌رغم بهبود تجزیه و تخمیر خوراک) آن است که این افزودنی‌های میکروبی موجب مسیردهی مواد مغذی به سمت افزایش تولید توده میکروبی و فرآورده‌های مفید تخمیری می‌شوند (Uyeno *et al*., 2015) و با افزایش این مسیردهی، سهم کمتری از منابع مغذی به سمت تولید گازها خواهد رفت، به‌طوری که سهم پروتئین میکروبی، تولید اسیدهای چرب فرار و نسبت پروپیونات در تحقیق حاضر نیز بیشتر بود. به‌علاوه، بیوچار با ساختار ویژه خود می‌تواند موجب کاهش جمعیت باکتری‌های متان‌زا و افزایش جمعیت باکتری‌های مصرف‌کننده متان شود و بنابراین قادر است آزادسازی گازها را کاهش دهد (Porsavathdy *et al*., 2017; Saleem *et al*., 2018). بنابراین، کاربرد همزمان افزودنی‌های مورد آزمون در پژوهش حاضر موجب بهبود بازده هضم و تخمیر جیره شد، بدون آن که افزایشی در آزادسازی گازها به محیط زیست رخ دهد.

چنان که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، منابع پروبیوتیکی و بیوچار به تنهایی یا در کنار هم موجب کاهش تولید متان در هر دو زمان انکوباسیون ۲۴ و ۷۲ ساعته شدند (P<۰/۰۵)، اما بیشترین درصد افت تولید متان نسبت به شاهد در جیره‌های پروبیوتیکی حاوی بیوچار (باسیل-بیوچار، لاکتوباسیل-بیوچار و باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار) مشاهده شد، که باز هم تأییدکننده فرضیه تحقیق مبنی بر

اثر تقویت‌کنندگی بیوچار بر عملکرد پروبیوتیک‌ها است. یکی از دلایل کاهش درصد متان در جیره‌های پروبیوتیکی مصرفی در پژوهش حاضر به جمعیت پروتوزوآیی کمتر این تیمارها (جدول ۲) مربوط است، زیرا پروتوزوآها به عنوان انتقال‌دهندگان هیدروژن به جمعیت‌های باکتریایی متان‌زا عمل می‌کنند (Morgavi *et al*., 2010; Mosoni *et al*., 2011). دلیل دیگر را باید به کاهش رخ داده در نسبت استات به پروپیونات مرتبط دانست، یعنی با افزایش مسیردهی هیدروژن به سمت پروپیونات، درصد کمتری از کربن و هیدروژن صرف تولید متان شده است. بیوچار نیز بر اساس توضیح قبل، با کاهش جمعیت تولیدکنندگان متان و افزایش جمعیت مصرف‌کنندگان اختصاصی متان باعث کاهش انتشار متان می‌شود (Porsavathdy *et al*., 2017; Saleem *et al.*, 2018). بر این اساس، قرار گرفتن این دو گروه افزودنی در کنار یکدیگر موجب بیشترین کنترل در آزادسازی متان شد. در مورد مصرف بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی نتایج خاصی در دست نیست، اما در مطالعات دیگر نیز موافق با پژوهش حاضر، کاهش متان با استفاده از افزودنی باسیلوسی (Seo *et al*., 2010)، پروبیوتیک‌های خانواده باسیلی، لاکتوباسیلی و مخمر (Ashkvari, 2019) و بیوچار (Porsavathdy *et al*., 2017; Saleem *et al.,* 2018; Saroeun *et al*., 2018) اشاره شده است.

میزان pH بین تیمارهای مختلف، اختلافات اندکی نشان داد، اما در تمامی گروه‌ها در دامنه مطلوب برای میکروب‌های شکمبه‌ای شکمبه قرار داشت (McDonald *et al.,* 2022) و این یافته نشان می‌دهد که پروبیوتیک و یا بیوچار موجب بهبود تجزیه خوراک و افزایش فرآورده‌های تخمیری مانند اسیدهای چرب فرار می‌شوند، بدون آن که افت قابل توجهی در pH رخ دهد و این نکته مطلوبی است. به عنوان یک متغیر مهم دیگر، غلظت نیتروژن آمونیاکی، طی انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته، با افزودن باسیل، لاکتوباسیل، بیوچار و ترکیب پروبیوتیک‌ها-بیوچار به جیره در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر شد ($P<۰/۰۵$). افت آمونیاک در زمان ۲۴ ساعت شدیدتر بود (بیشترین کاهش آمونیاک، ۴۳ و ۳۰ درصد نسبت به شاهد به ترتیب در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته) و کمترین غلظت آن در انکوباسیون ۲۴ ساعته و در گروه لاکتوباسیل-بیوچار مشاهده شد. با گذشت ۷۲ ساعت از انکوباسیون، کمترین غلظت مربوط به تیمار مخلوط باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار بود. این روند کاهشی در غلظت آمونیاک به دلیل تغییرات در فعالیت آنزیم پروتئاز و جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک نبود، زیرا این عوامل بین تیمارها اختلاف خاصی نداشتند، اما یکی از دلایل مهم کاهش نیتروژن آمونیاکی در اثر افزودنی‌های حاضر را می‌توان به افزایش قابل توجه در تولید توده میکروبی (جدول ۴) نسبت داد یعنی سهم بیشتری از آمونیاک وارد پیکره میکروارگانیسم‌ها شد (Wu, 2018)، که به ویژه با افزایش مشاهده شده در جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک در تیمارهای باسیل، بیوچار و پروبیوتیک-بیوچار نیز مطابقت دارد زیرا آمونیاک منبع اصلی نیتروژن برای رشد باکتری‌های مذکور است (Dehority, 2003; Millen *et al.,* 2016; Wu, 2018). دلیل دیگر را باید به کاهش جمعیت پروتوزوآیی (در تیمارهای پروبیوتیکی یا پروبیوتیک-بیوچار) نسبت داد که هدردهنده منابع نیتروژن به شکل آمونیاک هستند و کاهش آنها موجب افت غلظت آمونیاک می‌شود (Wu, 2018). اثر مصرف همزمان پروبیوتیک-بیوچار بر غلظت آمونیاک شکمبه تاکنون گزارش نشده است. به هر حال، افزودن پروبیوتیک‌های *B. licheniformis* (Qiao *et al*., 2010)، *B. amyloliquefaciens* (Le *et al*., 2017) و ترکیب *L. acidophilus* و *S. cerevisiae* (Sheikh *et al.,* 2022) در تحقیقات دیگر نیز موجب افت نیتروژن آمونیاکی شد. در برخی تحقیقات نیز بیوچار کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی را در پی داشت (Cabeza *et al*., 2018; Mirheidari *et al.,* 2018b). البته، نتایج متناقض نیز در مورد تأثیر پروبیوتیک‌های مختلف (Qiao *et al*., 2010; Sun *et al*., 2013; Chen *et al.,* 2017; Ashkvari, 2019) و بیوچار (Leng *et al*., 2012; Mirheidari *et al.,* 2018a) وجود دارد. در کل، نتایج این بخش از تحقیق حاکی از تأثیر مثبت گنجاندن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی بر تولید توده و پروتئین میکروبی و کاهش هدرروی نیتروژن به‌صورت آمونیاک بود.

جدول ۵- اثر جیره‌های حاوی پروبیوتیک، بیوچار و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار بر تولید گاز، متان، قدرت آنتی‌اکسیدانی، pH و آمونیاک شکمبه گوسفند در شرایط برون‌تنی

Table 5. Effect of diets containing probiotic, biochar, and probiotic-biochar mixture on gas production, methane, total antioxidant capacity, pH, and ammonia in sheep rumen, *in vitro*

Diet[1]	TAC[2] (μmol Fe^{2+}/L)	GP (mL/g DM)	Methane (% of GP)	Relative methane reduction (%)	pH	Ammonia-N (mg/dL)
24-h incubation						
Control	1324	257[a]	26.10[a]	-	6.76	15.41[a]
BAC	1261	254[a]	24.27[b]	7.00	6.63	9.30[e]
LAC	1256	248[a]	24.59[ab]	5.78	6.74	9.97[b]
BIO	1300	218[b]	23.24[b]	10.94	6.70	10.19[b]
BAC-BIO	1307	210[bc]	23.52[b]	9.87	6.61	9.15[e]
LAC-BIO	1311	201[c]	23.77[b]	8.90	6.77	8.70[d]
BAC-LAC-BIO	1357	206[bc]	23.86[b]	8.57	6.64	9.29[e]
SEM[3]	76.66	5.96	0.652	-	0.059	0.292
P-value	0.77	<0.001	0.002	-	0.078	<0.001
72-h incubation						
Control	1500	314[a]	31.94[a]	-	6.64	19.94[a]
BAC	1570	304[a]	29.33[bc]	8.19	6.58	17.55[c]
LAC	1560	308[a]	30.21[b]	5.43	6.59	18.76[b]
BIO	1609	261[b]	27.75[d]	13.14	6.67	15.68[d]
BAC-BIO	1657	249[bc]	29.04[c]	9.08	6.65	15.60[d]
LAC-BIO	1624	241[c]	28.44[cd]	10.96	6.62	15.46[d]
BAC-LAC-BIO	1638	249[bc]	28.74[cd]	10.02	6.61	13.92[e]
SEM	52.32	9.17	0.473	-	0.041	0.513
P-value	0.058	<0.001	<0.001	-	0.12	<0.001

[1] Control: Diet without probiotics and biochar; BAC: Diet containing Bacillali; LAC: Diet containing Lactobacilli; BIO: Diet containing biochar; BAC-BIO: Diet containing Bacillali and biochar; LAC-BIO: Diet containing Lactobacilli and biochar; BAC-LAC-BIO: Diet containing Bacillali, Lactobacilli and biochar.

[2] TAC: Total antioxidant capacity; GP: Gas production at 24 or 72 h after incubation.

[3] SEM: Standard error of the means. For 24 and 72-h incubations, the means in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

در نهایت، نتایج جدول ۶ نشان داد که مصرف مکمل‌های پروبیوتیک، بیوچار و ترکیب آنها موجب افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار حاصل از تخمیر برون‌تنی جیره‌های آزمایشی در مقایسه با شاهد شد (P<۰/۰۵). به هر حال، در مقایسه با گروه‌های باسیل، لاکتوباسیل و بیوچار، افزودن بیوچار به جیره‌های پروبیوتیکی (یعنی مصرف مخلوط پروبیوتیک‌ها-بیوچار) موجب افزایش بیشتری در غلظت کل اسیدهای چرب فرار شد. علت این بهبود را می‌توان به سادگی به افزایش سوبسترای تجزیه شده و قابلیت هضم مرتبط دانست (Wu, 2018) و این نتیجه با بهبود در تعداد باکتری‌های سلولولیتیک، فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک و آلفاآمیلاز در گروه‌های حاوی افزودنی قابل توجیه است. از سوی دیگر، مشاهده بیشترین مقدار کل اسیدهای چرب فرار با مصرف مخلوط پروبیوتیک-بیوچار را می‌توان از راه فعالیت آنزیمی زیادتر و سوبسترای تجزیه شده بیشتر در این گروه‌ها تفسیر نمود و مفهوم آن، استحصال بیشترین انرژی از جیره‌های پروبیوتیکی با گنجاندن بیوچار در آنها (پروبیوتیک-بیوچار) است. محققان بیان کردند که تغذیه پروبیوتیک باعث تحریک باکتری‌های سلولولیتیک می‌شود و الیاف بیشتری در شکمبه هضم می‌شود که باعث افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار خواهد شد (Qiao *et al*., 2010). در تأیید نتایج حاضر، محققان دیگر نیز افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار را در اثر مصرف مکمل‌های پروبیوتیکی *L. acidophilus* و *S. cerevisiae* (Sheikh *et al*., 2022)، باسیل و لاکتوباسیل (Ashkvari, 2019) و نیز بیوچار (Pereira *et al*., 2014) گزارش کردند. به هر حال، نتایج متناقض نیز در مورد اثر پروبیوتیک‌ها (Soren *et al*., 2013; Le *et al*., 2017) و بیوچار (McFarlane *et al.,* 2017; Cabeza *et al.,* 2018; Mirheidari *et al*., 2019; Teoh *et al*., 2019) در دسترس است.

جدول ۶- اثر جیره‌های حاوی پروبیوتیک، بیوچار و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار بر غلظت کل (میلی‌مول در لیتر) و نسبت مولار (درصد) اسیدهای چرب فرار شکمبه گوسفند در شرایط برون‌تنی

Table 6. Effect of diets containing probiotic, biochar and probiotic-biochar mixture on total concentration (mmol/L) and molar proportion (%) of volatile fatty acids in sheep rumen, *in vitro*

Diet[1]	Total	Acetate (A)	Propionate (P)	Butyrate	Isobutyrate	Valerate	Isovalerate	A:P
24-h incubation								
Control	78.84^{b}	66.89^{a}	17.61^{b}	12.72	2.33	0.19	0.26	3.80^{a}
BAC	83.62^{ab}	63.43^{ab}	20.65^{ab}	13.21	2.28	0.19	0.24	3.08^{b}
LAC	84.38^{ab}	61.69^{b}	22.45^{a}	12.82	2.50	0.22	0.32	2.79^{c}
BIO	84.64^{ab}	65.11^{ab}	19.64^{ab}	12.10	2.65	0.20	0.30	3.31^{b}
BAC-BIO	86.96^{a}	64.12^{ab}	19.89^{ab}	12.89	2.62	0.21	0.27	3.22^{b}
LAC-BIO	85.30^{a}	61.77^{b}	22.05^{a}	13.32	2.37	0.22	0.27	2.83^{c}
BAC-LAC-BIO	86.20^{a}	61.63^{b}	22.02^{a}	13.53	2.33	0.21	0.28	2.80^{c}
SEM[2]	3.02	1.38	1.28	1.01	0.147	0.040	0.024	0.111
P-value	0.032	0.024	0.023	0.87	0.46	0.89	0.49	0.013
72-h incubation								
Control	80.80^{b}	69.20^{a}	16.86	11.19	2.26	0.19	0.30	4.11^{a}
BAC	86.40^{ab}	66.57^{ab}	17.17	13.07	2.65	0.21	0.33	3.89^{ab}
LAC	88.76^{ab}	66.04^{b}	18.13	12.93	2.38	0.21	0.31	3.65^{b}
BIO	87.72^{ab}	66.78^{ab}	17.81	12.07	2.83	0.20	0.31	3.76^{ab}
BAC-BIO	89.42^{ab}	67.70^{ab}	17.50	11.49	2.78	0.20	0.33	3.87^{ab}
LAC-BIO	91.68^{ab}	66.25^{b}	17.99	12.45	2.81	0.19	0.31	3.68^{b}
BAC-LAC-BIO	96.90^{a}	66.28^{b}	18.73	11.88	2.61	0.19	0.31	3.54^{b}
SEM	4.49	0.996	0.828	0.627	0.346	0.015	0.025	0.154
P-value	0.026	0.031	0.076	0.38	0.75	0.73	0.67	0.034

[1] Control: Diet without probiotics and biochar; BAC: Diet containing Bacillali; LAC: Diet containing Lactobacilli; BIO: Diet containing biochar; BAC-BIO: Diet containing Bacillali and biochar; LAC-BIO: Diet containing Lactobacilli and biochar; BAC-LAC-BIO: Diet containing Bacillali, Lactobacilli and biochar.

[2] SEM: Standard error of the means. For 24 and 72-h incubations, the means in the same column with different superscripts differ (P<0.05).

گنجاندن لاکتوباسیل، لاکتوباسیل-بیوچار و لاکتوباسیل-باسیل-بیوچار در جیره موجب افزایش غلظت پروپیونات، و کاهش غلظت استات در مقایسه با گروه شاهد (به ویژه در انکوباسیون ۲۴ ساعته) شد (P<۰/۰۵). غلظت استات در گروه باسیل، بیوچار و باسیل-بیوچار در مقایسه با شاهد روند کاهشی داشت (البته غیرمعنی‌دار)، اما نسبت استات به پروپیونات در تیمارهای پروبیوتیک و/یا بیوچار در قیاس با گروه شاهد، کاهش معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵) و این کاهش در انکوباسیون ۲۴ ساعته و در گروه‌های حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلی بیشتر بود. درصد مولار بوتیرات، ایزوبوتیرات، والرات و ایزووالرات در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. نوسانات در غلظت استات و پروپیونات در این آزمایش با تغییرات مشاهده شده در میزان متان، فعالیت آلفاآمیلاز و جمعیت پروتوزوآیی مطابقت داشت، به‌طوری که بیشترین فعالیت آلفاآمیلازی در گروه‌های لاکتوباسیلی مشاهده شد و بدیهی است که افزایش فعالیت آلفاآمیلاز با تجمع بیشتر پروپیونات، رابطه مستقیم دارد (McDonald *et al.,* 2022). همچنین، کاهش در جمعیت پروتوزوآ و متان شکمبه‌ای با مسیردهی هیدروژن به سمت پروپیونات و کاهش نسبت استات به پروپیونات همراه خواهد بود (Morgavi *et al.,* 2010; Mosoni *et al.,* 2011). موافق با نتایج پژوهش حاضر، در برخی مطالعات، افزودن مکمل پروبیوتیکی گونه *B. subtilis* به جیره، غلظت پروپیونات را افزایش و نسبت استات به پروپیونات را کاهش داد (Sun *et al*., 2011, 2013). در یک آزمایش برون‌تنی دیگر، افزودن پروبیوتیک باسیلی به جیره موجب یک روند افزایشی در درصد استات و پروپیونات و کاهش درصد بوتیرات شکمبه‌ای شد، اما گونه‌های لاکتوباسیلی، درصد استات و بوتیرات را کاهش و درصد پروپیونات را افزایش دادند (Ashkvari, 2019). در مورد بیوچار نیز نتایج متفاوت حاکی از عدم تأثیر بر نسبت استات به پروپیونات (McFarlane *et al*., 2017; Mirheidari *et al*., 2019; Teoh *et al*., 2019) و گاه افت

پروپیونات و بوتیرات (Cabeza *et al*., 2018) در تحقیقات مختلف بود.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، گنجاندن پروبیوتیک باسیلی (مخلوط *B. coagulans*، *B. subtilis* و *B. licheniformis*) و پروبیوتیک لاکتوباسیلی (مخلوط *L. plantarum*، *L. rhamnosus* و *Enterococcus faecium*) و بیوچار (مخلوط چوب انار و آلو) به‌صورت مجزا در جیره موجب بهبود جمعیت میکروبی، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک، تولید توده میکروبی و قابلیت هضم شد و اتلاف منابع به‌صورت متان و آمونیاک را کاهش داد. از سوی دیگر، افزودن بیوچار به جیره‌های حاوی پروبیوتیک (ترکیب باسیل-بیوچار، لاکتوباسیل-بیوچار یا باسیل-لاکتوباسیل-بیوچار)، متغیرهای تخمیر و هضم را بهبود بیشتری داد و آزادسازی متان و نیتروژن آمونیاکی را به کمترین میزان رساند. بنا بر یافته‌های بالا، راه‌کار افزودن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی با هدف افزایش بهره‌وری جیره‌های حاوی پروبیوتیک قابل توصیه است، هر چند تحقیقات بیشتری به ویژه در شرایط درون‌تنی لازم است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند مراتب قدردانی خویش را از شرکت‌های محترم نامبرده در متن مواد و روش‌ها و نیز دانشگاه تربیت مدرس به دلیل حمایت مادی و معنوی از پژوهش حاضر، ابراز نمایند.

فهرست منابع

AFRC. (1993). *Energy and protein requirements of ruminants*. Agricultural and Food Research Council, Technical Committee on Responses to Nutrients. CABI Publisher. Wallingford, UK. 176 p.

Agarwal, N., Kamra D. N., Chaudhary, L. C., Sahoo, A., & Pathak N. N. (2002). Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives. *Letters in Applied Microbiology*, *34*, 329-336. doi: 10.1046/j.1472-765X.2002.01092.x

Anele, U. Y., Südekum, K. H., Hummel, J., Arigbede, O. M., Oni, A. O., Olanite, J. A., Böttger, C., Ojo, V. O., & Jolaosho, A. O. (2011). Chemical characterization, *in vitro* dry matter and ruminal crude protein degradability and microbial protein synthesis of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) haulm varieties. *Animal Feed Science and Technology*, *163*(2-4), 161-169. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.11.005

Ashkvari, A. (2019). Effect of Lactobacillales, Bacillales and/or yeast on *in vitro* ruminal fermentation, microbial populations and hydrolytic enzymes activities. MSc Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. [In Persian]

Astuti, W. D., Ridwan, R., Fidriyanto, R., Rohmatussolihat, R., Sari, N. F., Sarwono, K. A., Fitri, A., & Widyastuti, Y. (2022). Changes in rumen fermentation and bacterial profiles after administering Lactiplantibacillus plantarum as a probiotic. *Veterinary World*, *15*(8), 1969-1974. doi: 10.14202/vetworld.2022.1969-1974

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292

Cabeza, I., Waterhouse, T., Sohi, S., & Rooke, J. A. (2018). Effect of biochar produced from different biomass sources and at different process temperatures on methane production and ammonia concentrations *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, *237*, 1-7. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2018.01.003

Chen, L., Ren, A., Zhou, C., & Tan, Z. (2017). Effects of Lactobacillus acidophilus supplementation for improving *in vitro* rumen fermentation characteristics of cereal straws. *Italian Journal of Animal Science*, *16*(1), 52-60. doi: 10.1080/1828051X.2016.1262753

Dehority, B. A. (2003). *Rumen microbiology*, 1st ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 372 p.

Di Gioia, D., & Biavati, B. (2018). *Probiotics and prebiotics in animal health and food safety*. Springer International Publishing, Gewerbestrasse, Switzerland. 273 p.

Galyean, M. L. (2010). *Laboratory procedures in animal nutrition research*. Department of Animal and Food Sciences, Texas Tech University, Lubbock, TX, USA. 189 p.

Le, O. T., Schofield, B., Dart, P. J., Callaghan, M. J., Lisle, A. T., Ouwerkerk, D., Klieve, A. V., & McNeill, D. M. (2016). Production responses of reproducing ewes to a by-product-based diet inoculated with the probiotic Bacillus amyloliquefaciens strain H57. *Animal Production Science*, *57*(6), 1097-1105. doi: 10.1071/AN16068

Leng, R. A., Inthapanya, S., & Preston, T. R. (2013). All biochars are not equal in lowering methane production in *in vitro* rumen incubations. *Livestock Research for Rural Development*, *25*(6), #106.

Leng, R. A., Preston, T. R., & Inthapanya, S. (2012). Biochar reduces enteric methane and improves growth and feed conversion in local "Yellow" cattle fed cassava root chips and fresh cassava foliage. *Livestock Research for Rural Development*, 24(11), #199.

Makkar, H. P. S. (2010). *In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies*. Vercoe P. E., Makkar H. P. S. and Schlink A. C. ed. *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. IAEA, Dordrecht, the Netherlands.

Manhar, A. K., Bashir, Y., Saikia, D., Nath, D., Gupta, K., Konwar, B. K., Kumar, R., Namsa, N. D., & Mandal, M. (2016). Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus Subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): An *in vitro* study with regards to application as an animal feed additive. *Microbiological Research*, *186*, 62-70. doi: 10.1016/j.micres.2016.03.004

McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkingson R. G. (2022). *Animal nutrition*, 7th ed. Prentice Hall, Essex, UK. 736 p.

McFarlane, Z. D., Myer, P. R., Cope, E. R., Evans, N. D., Bone, T. C., Bliss, B. E., & Mulliniks, J. T. (2017). Effect of biochar type and size on *in vitro* rumen fermentation of orchard grass hay. *Agricultural Sciences*, *8*, 316-325. doi: 10.4236/as.2017.84023

Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*, *93*(1), 217-222. doi: 10.1017/S0021859600086305

Millen, D. D., Arrigoni, M. D. B., & Pacheco, R. D. L. (2016). *Rumenology*. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany. 330 p.

Mirheidari, A., Torbatinejad, N., Hasani, S., & Shakeri, P. (2018a). Effects of pistachio by-product biochar on performance, microbial protein, some of ruminal fermentation parameters and blood metabolites in fattening lambs. *Animal Sciences Journal*, *30*(117), 151-162. doi: 10.22092/asj.2017.109299.1382 [In Persian]

Mirheidari, A., Torbatinejad, N. M., Hassani, S., & Shakeri, P. (2018b). Effect of different levels of walnut shell and chicken manure biochar on ruminal fermentation parameters and methane production. *Journal of Ruminant Research*, *1*, 1-16. doi: 10.22069/ejrr.2017.13198.1546 [In Persian]

Mirheidari, A., Torbatinejad, N. M., Shakeri, P., & Mokhtarpour, A. (2019). Effects of walnut shell and chicken manure biochar on *in vitro* fermentation and *in vivo* nutrient digestibility and performance of dairy ewes. *Tropical animal Health and Production*, *51*, 2153-2160. doi: 10.1007/s11250-019-01909-y

Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, *4*(7), 1024-1036. Doi: 10.1017/S1751731110000546

Mosoni, P., Martin, C., Forano, E., & Morgavi, D. P. (2011). Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science*, *89*(3), 783-791. doi: 10.2527/jas.2010-2947

NRC. (2007). *Nutrient requirements of small ruminants*. National Research Council, Natl. Acad. Press, Washington, DC, USA. 341 p.

Porsavathdy, P., Phongphanith, S., Preston, T. R., & Leng, R. A. (2017). Methane production in an *in vitro* rumen fermentation of molasses-urea was reduced by supplementation with fresh rather than dried cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) leaves and by biochar. *Livestock Research for Rural Development*, *29*(3), #41.

Prasai, T. P., Walsh, K. B., Bhattarai, S. P., Midmore, D. J., Van, T. T., Moore, R. J., & Stanley, D. (2016). Biochar, bentonite and zeolite supplemented feeding of layer chickens alters intestinal microbiota and reduces campylobacter load. *PLoS One*, *11*(4), e0154061. doi: 10.1371/journal.pone.0154061

Qiao, G. H., Shan, A. S., Ma, N., Ma, Q. Q., & Sun, Z. W. (2010). Effect of supplemental *Bacillus* cultures on rumen fermentation and milk yield in Chinese Holstein cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *94*(4), 429-436. doi: 10.1111/j.1439-0396.2009.00926.x

Radzikowski, D. (2017). Effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the productivity and health of dairy cows and calves. *World Scientific News*, *78*, 193-198.

Rashidi, N., Khatibjoo, A., Taherpour, K., Akbari Gharaei, M., & Shirzadi, H. (2018). Effect of licorice extract, probiotic, antifungal and biochar on performance of broiler chickens fed aflatoxin B1 contaminated diet. *Animal Production*, *20*(1), 145-157. doi 10.22059/jap.2018.246192.623242 [In Persian]

Rigobelo, E. C. (2012). *Probiotic in animals*. InTech, Rijeka, Croatia. 272 p.

Saleem, A. M., Ribeiro Jr, G. O., Yang, W. Z., Ran, T., Beauchemin, K. A., McGeough, E. J., Ominski, K. H., Okine, E. K., & McAllister, T. A. (2018). Effect of engineered biocarbon on rumen fermentation, microbial protein synthesis, and methane production in an artificial rumen (RUSITEC) fed a high forage diet. *Journal of Animal Science*, *96*(8), 3121-3130. doi: doi.org/10.1093/jas/sky204

Saroeun, K., Preston, T. R., & Leng, R. A. (2018). Rice distillers' byproduct and molasses-urea blocks containing biochar improved the growth performance of local Yellow cattle fed ensiled cassava roots, cassava foliage and rice straw. *Livestock Research for Rural Development*, *30*(9), #162.

Seo, J. K., Kim, S. W., Kim, M. H., Upadhaya, S. D., Kam, D. K., & Ha, J. K. (2010). Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *23*(12), 1657-1667. doi: 10.5713/ajas.2010.r.08

Sheikh, G. G., Ganai, A. M., Ahmad Sheikh, A., & Mir, D. M. (2022). Rumen microflora, fermentation pattern and microbial enzyme activity in sheep fed paddy straw based complete feed fortified with probiotics. *Biological Rhythm Research*, *53*(4), 547-558. doi: 10.1080/09291016.2019.1644019

Silivong, P., & Preston, T. R. (2015). Growth performance of goats was improved when a basal diet of foliage of Bauhinia acuminata was supplemented with water spinach and biochar. *Livestock Research for Rural Development*, *27*(3), #58.

Sirjani, M. H., Rezaei, J., Zahedifar, M., & Rouzbehan, Y. (2022). Effect of adding biochar in diets containing probiotics on *in vitro* fermentation variables, health indicators, rectum bacteria, and blood enzymes of Holstein calves. *Animal Production Research*, *11*(4), 1-19. doi: 10.22124/ar.2023.23067.1727 [In Persian]

Soren, N. M., Tripathi, M. K., Bhatt, R. S., & Karim, S. A. (2013). Effect of yeast supplementation on the growth performance of Malpura lambs. *Tropical Animal Health and Production*, *45*, 547-554. doi: 10.1007/s11250-012-0257-3

Sun, P., Wang, J. Q., & Deng, L. F. (2013). Effects of *Bacillus subtilis* natto on milk production, rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows. *Animal*, *7*(2), 216-222. doi: 10.1017/S1751731112001188

Teoh, R., Caro, E., Holman, D. B., Joseph, S., Meale, S. J., & Chaves, A. V. (2019). Effects of hardwood biochar on methane production, fermentation characteristics, and the rumen microbiota using rumen simulation. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1534. doi: 10.3389/fmicb.2019.01534

Tilley, J. M. A., & Terry, D. R. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, *18*(2), 104-111. doi: 10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x

Uyeno, Y., Shigemori, S., & Shimosato, T. (2015). Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and Environments*, *30*(2), 126-132. doi: 10.1264/jsme2.ME14176

Wu, G. (2018). *Principles of animal nutrition*, 1th ed. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton FL, USA. 772 p.

Zhang, R., Dong, X., Zhou, M., Tu, Y., Zhang, N., Deng, K., & Diao, Q. (2017). Oral administration of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* on rumen fermentation and the bacterial community in calves. *Animal Science Journal*, *88*(5), 755-762. doi: 10.1111/asj.12691