تحقیقات تولیدات دامی

سال هفتم/شماره چهارم/زمستان ۱۳۹۷ (۴۶-۳۳)

Animal Production Research

اثر افزودن سطوح مختلف عصاره بره‌موم بر قابلیت هضم، تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه در شرایط برون‌تنی

مارال ایری[۱]، جواد بیات کوهسار[۲*]، فرزاد قنبری[۲]، آشور محمد قره‌باش[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۴)

چکیده

مطالعه‌ای به منظور بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتانولی - متانولی (۵۰:۵۰) بره‌موم بر فراسنجه‌های تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی و جمعیت پروتوزوآ شکمبه و تولید متان در شرایط آزمایشگاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. بره‌موم از منطقه رامیان جمع‌آوری و عصاره‌گیری با اتانول، متانول و مخلوط اتانول و متانول انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: شاهد (جیره پایه با نسبت علوفه به کنسانتره ۵۰:۵۰ (تیمار ۱))، تیمارهای ۲ تا ۵ (تیمار شاهد + سطوح ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی)، تیمارهای ۶ تا ۹ (تیمار شاهد + سطوح ۲۵، ۵۰، ۱۰۰،۲۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی)، تیمارهای ۱۰ تا ۱۳ (تیمار شاهد + سطوح ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده با مخلوط اتانول و متانول) بودند. بالاترین و پایین‌ترین مقدار پتانسیل تولید گاز به ترتیب مربوط به تیمارهای دارای سطوح ۲۰۰ و ۲۵ میکرولیتر عصاره متانولی بره‌موم بود (P<۰/۰۵). تیمار دارای عصاره استخراج شده با مخلوط اتانول و متانول با سطح ۲۰۰ میکرولیتر بالاترین مقدار انرژی قابل متابولیسم، قابلیت هضم ماده آلی و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر را داشت (P<۰/۰۵). همچنین در این آزمایش، بین تیمارهای آزمایشی از نظر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). از این نظر، تیمارهای دارای سطوح ۲۵ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی و تیمار شاهد به ترتیب دارای بالاترین و پایین‌ترین قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی بودند (P<۰/۰۵). بیشترین کاهش در جمعیت هولوتریش‌ها در تیمارهای دارای سطوح ۲۵ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی – متانولی مشاهده شد (P<۰/۰۵). تیمارهای دارای عصاره بره‌موم به طور قابل ملاحظه‌ای مقدار تولید متان را کاهش دادند. به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت سطوح مختلف عصاره متانولی بره‌موم توان تغییر فرآیندهای تخمیر شکمبه‌ای را دارند، هر چند آزمایش‌های بیشتری برای دستکاری کردن تخمیر میکروبی شکمبه موردنیاز است.

واژه‌های کلیدی: انرژی قابل متابولیسم، تولید گاز، شرایط برون‌تنی، عصاره بره‌موم

* نویسندهٔ مسئول: javad_bayat@yahoo.com

مقدمه

استفاده از افزودنی‌ها در جیره غذایی نشخوارکنندگان موجب بهبود میزان تولید و بازده غذا و تثبیت اکوسیستم محیط شکمبه می‌شود (Fernandes *et al.*, 2008). از جمله این افزودنی‌ها یونوفرها هستند که قادرند با تأثیر بر باکتری‌های شکمبه، روند تخمیر شکمبه را تغییر دهند (Van soest, 1994). این مواد در مقابل باکتری‌های گرم مثبت بسیار مؤثر بوده و بر باکتری‌های گرم منفی (که دارای غشاهایی هستند که از ورود آن‌ها به سلول‌ها جلوگیری می‌کند) تأثیری ندارند (Duffield and Bagg, 2000). استفاده از یونوفرها در جیره‌های نشخوارکنندگان تأثیر خوبی بر تخمیر شکمبه و عملکرد تولیدمثلی حیوانات داشته است (Guan *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007). با این حال، در سال‌های اخیر استفاده از این ترکیبات با توجه به خطر انتقال باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی به گوشت و شیر و مقاوم شدن سویه‌های باکتریایی، با کاهش اقبال عمومی روبرو شده است (Oeztuerk *et al.*, 2009). بر این اساس، از ژانویه ۲۰۰۶ بسیاری از کشورها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دام‌های در حال رشد را ممنوع کرده‌اند (Oeztuerk and Sagmanligil, 2009). در نتیجه، این امر متخصصین تغذیه را بر آن داشت که به دنبال جایگزین‌های مناسبی باشند تا بتوانند تغییرات مطلوبی را در متابولیسم شکمبه (بدون داشتن اثرات سوء) ایجاد کرده و بازده غذایی و سودمندی حیوان را افزایش دهند (Ultee *et al.*, 1999). از جمله محرک‌های رشد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به اسیدهای آلی (Khamp and Wanapat, 2007)، آنزیم‌ها (Chung *et al.*, 2012)، مخمر (Stockdale and Gill, 2011)، اسانس گیاهان داروئی (Giannenas *et al.*, 2011; Sallam *et al.*, 2011) و اخیراً بره‌موم (گرچه توانایی آن برای دستکاری قابلیت هضم و به‌ویژه عکس‌العمل و پاسخ فیزیولوژیکی شکمبه در بسیاری از موارد ارزیابی نشده است اشاره داشت (Itavo *et al.*, 2011).

بره‌موم یک ماده صمغی است که به وسیله زنبور عسل (*Apis mellifera*) از جوانه‌ها و برگ‌های درختان و گیاهان جمع‌آوری شده و با گرده نیز مخلوط می‌شود (Zhou *et al.*, 2008). ترکیب شیمیایی بره‌موم بستگی به خصوصیات جغرافیایی پوشش گیاهی محل جمع‌آوری دارد. در زیستگاه‌های مختلف، زنبورها گونه‌های مختلف گیاهی را به‌عنوان منبع بره‌موم انتخاب می‌کنند و به همین دلیل ترکیب شیمیایی بره‌موم بسیار متغیر است (Seidel *et al.*, 2008). بره‌موم به طور معمول از ۳۰ درصد موم، ۵۰ درصد صمغ (به طور عمده فلاوونوئیدها و اسیدهای فنولی)، ۱۰ درصد اسانس‌های ضروری و مواد معطر گیاهی و ۵ درصد گرده تشکیل شده است (Burdock, 1998). بره‌موم حاوی انواع ترکیبات شیمیایی مانند پلی‌فنول‌ها (آگلیکون‌های فلاونوئید، اسیدهای فنولیک و استرهای آن، آلدئیدهای فنولیک، الکل‌ها و کتون‌ها)، کوئینون‌های سسکی‌ترپن، کومارین‌ها، استروئیدها، اسیدهای آمینه و ترکیبات غیر آلی است (Bankova, 2000). گرچه بره‌موم ترکیب شیمیایی متفاوتی را نشان داده است، با این حال فعالیت‌های چند منظوره دارویی مانند فعالیت‌های ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانتی آن ثابت شده است (Seidel *et al.*, 2008). فعالیت ضد میکروبی بیشتر بره‌موم علیه باکتری گرم مثبت در مقابل باکتری گرم منفی، منجر به بهبود بازده خوراک می‌شود، زیرا باکتری‌های گرم مثبت، آمونیاک، هیدروژن و لاکتات بیشتری از گونه‌های گرم منفی تولید می‌کنند (Russell and Strobel, 1988)، همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اجزای بره‌موم، تنش اکسایشی را کاهش داده و شرایط بهتری برای رشد میکروبی شکمبه و در نتیجه افزایش فرآیند تخمیر فراهم می‌کنند (Cattani *et al.*, 2012). مکانیسم عمل بره‌موم احتمالاً مرتبط با تغییرات وضعیت بیوانرژی غشاء باکتریایی است که مانع از تحرک باکتری‌ها می‌شود. این عمل مشابه عمل یونوفرها است (Burdock, 1998). برخی مطالعات نشان داده‌اند که عصاره بره‌موم در مقایسه با تیمار شاهد، در مجموع تولید گاز نهایی را برای کربوهیدرات‌های الیافی کاهش می‌دهد (Stradiotti *et al.*, 2004). با این حال، در مطالعه‌ای نشان داده شد بره‌موم بدون اینکه بر تولید گاز شکمبه و تجزیه‌پذیری ماده آلی در شرایط آزمایشگاهی تأثیر منفی داشته باشد، تاثیر کاهشی بر مقدار تولید متان داشت (Morsy *et al.*, 2011). از این نظر بره‌موم ممکن است یک جایگزین طبیعی مکمل آنتی‌بیوتیک برای اصلاح تخمیر میکروبی در شکمبه به منظور کاهش از دست رفتن انرژی از جمله متان و نیتروژن

به عنوان آمونیاک از جیره غذایی باشد. علاوه بر این، عصاره اتانولی بره‌موم تخمیر و تولید متان را در شرایط آزمایشگاهی متأثر ساخته و این کار را از راه کاهش جمعیت پروتوزوآ و افزایش سطوح پروپیونات تا ۱۰/۳ درصد، بدون تأثیر بر دیگر اسیدهای چرب شکمبه‌ای انجام می‌دهد (Brodiscou *et al.*, 2000). به هر حال، توانایی بره‌موم برای دستکاری تخمیر میکروبی شکمبه به طور گسترده‌ای مورد ارزیابی قرار نگرفته است. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی افزودن سطوح مختلف عصاره‌های اتانولی و متانولی بره‌موم بر قابلیت هضم، فراسنجه‌های تخمیری شکمبه و تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و تهیه عصاره: در این مطالعه نمونه‌های بره‌موم از ارتفاعات شهرستان رامیان واقع در استان گلستان جمع‌آوری شد. عصاره‌گیری بره‌موم (Alencar *et al.*, 2007) با بعضی تغییرات در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. بره‌موم حاصل با استفاده از نیتروژن مایع به صورت پودر درآمد. سپس مقدار ۱۰ گرم از پودر بره‌موم حاصل با استفاده از توری یک میلی‌متری به صورت جداگانه آسیاب شده و با مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتری اتانول ۷۰ درصد مخلوط شد. مخلوط حاصل به دستگاه اولتراسونیک منتقل و پس از ۳۰ دقیقه محلول عصاره اتانولی با استفاده از کاغذ واتمن (شماره ۴۱) فیلتر و محلول استخراج شده در طول شب و در دمای فریزر (۵- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس دوباره فیلتر و عصاره حاصل به دستگاه تبخیر کننده چرخان در دمای تقریبی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه منتقل شد تا حلال الکلی جدا شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. این مراحل برای متانول و مخلوط اتانول و متانول نیز انجام شد.

اندازه‌گیری فنل کل: محتوای فنل کل موجود در بره‌موم با استفاده از روش فولین-سیوکالتو اندازه‌گیری شد (Malick and Singh, 1980). ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره بره‌موم با ۰/۸ میلی‌لیتر فولین (رقیق شده با آب به نسبت ۱:۱) و ۱/۲ میلی‌لیتر از سدیم کربنات ۲۰ درصد مخلوط شد. سدیم کربنات به خاطر قلیایی شدن محیط، سبب فعالیت بهتر فولین می‌شود. رقت‌های مختلف اسید گالیک بین ۰/۰۲۵ تا ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان استاندارد تهیه شد. لوله‌ها برای انکوبه شدن در دمای اتاق و در مکان تاریک به‌مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ده دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و با دستگاه طیف‌سنج نوری در طول موج ۷۲۵ نانومتر درون سل خوانده شدند. مقدار فنل کل بر اساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک (mg GAE/g) در هر گرم عصاره خشک بیان شد (Cottica *et al.*, 2011).

اندازه‌گیری فلاوونوئید کل با روش آلومینیوم کلراید: یکی از روش‌های اندازه‌گیری فلاوونوئید کل با استفاده از آلومینیوم کلراید است (Chang *et al.*, 2002). در این روش، ۱۰ میلی‌گرم کورستین با اتانول ۸۰ درصد رقیق شده و از رقت‌های مختلف کورستین (۲۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) به عنوان استاندارد استفاده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره اتانولی بره‌موم با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر از آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد محلول در اتانول و ۰/۱ میلی‌لیتر از پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. در نهایت لوله‌ها در دمای اتاق و در مکان تاریک به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس با دستگاه طیف‌سنج نوری در طول موج ۴۱۵ نانومتر در داخل کووت قرائت شدند (Cottica *et al.*, 2011).

اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی: به منظور اندازه‌گیری مقدار گاز تولیدی تیمارهای مختلف، از آزمون تولید گاز استفاده شد (Menke *et al.*, 1979). تیمارهای آزمایشی شامل تیمار شاهد (جیره پایه با نسبت علوفه به کنسانتره ۵۰:۵۰ (تیمار ۱))، تیمارهای ۲ تا ۵ (تیمار شاهد + سطوح ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی بره‌موم)، تیمارهای ۶ تا ۹ (تیمار شاهد + سطوح ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی بره‌موم) و تیمارهای ۱۰ تا ۱۳ (تیمار شاهد + سطوح ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مخلوط اتانول + متانول) بودند. جیره پایه بر اساس ماده خشک شامل علوفه (یونجه) + کنسانتره (۳۴ درصد جو، ۳۰ درصد ذرت، ۸ درصد سویا، ۱۲ درصد تخم پنبه، ۵ درصد تفاله چغندر قند، ۱۰ درصد سبوس و ۰/۳ درصد کربنات

کلسیم، ۰/۲ درصد نمک و ۰/۵ درصد مکمل معدنی-ویتامینی) به نسبت ۵۰:۵۰ بود. مایع شکمبه از سه رأس گوسفند دارای فیستولای شکمبه‌ای و قبل از خوراک صبح-گاهی بدست آمد و با پارچه چهار لایه متقال صاف شد. به منظور ایجاد شرایط بی‌هوازی، گاز دی‌اکسید کربن به مایع شکمبه صاف شده تزریق و در بن ماری با دمای ۳۸/۶ درجه سلسیوس قرار داده شد. بزاق مصنوعی تهیه و با شیرابه شکمبه با نسبت ۲:۱ (مایع شکمبه: بافر) مخلوط شد. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم جیره پایه به همراه ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی به ویال‌های شیشه‌ای اضافه شد (سه تکرار برای هر تیمار). سر ویال‌ها به کمک درپوش پلاستیکی و پوشش آلومینیومی به طور کامل بسته شده و در حمام آب گرم با دمای ۳۸/۶ درجه سلسیوس برای انکوباسیون قرار داده شد. به منظور تصحیح گاز تولید شده ناشی از ذرات باقی‌مانده در مایع شکمبه، سه تکرار بلانک و نیز برای تصحیح اثر عصاره الکلی بر جیره پایه در نظر گرفته شد. فشار گاز تولید شده در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون قرائت شد. حجم خالص گاز با کاستن میانگین گاز تولیدی ویال‌های بلانک از ویال‌های دارای نمونه حاصل شد (Theodorou *et al.*, 1994). تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک معادله ($P=b(1-e^{-ct})$) انجام شد (Ørskov and McDonald, 1979). در این معادله، فراسنجه b گاز تولیدی از بخش قابل تخمیر (میلی-لیتر)، c ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، t زمان انکوباسیون بر حسب ساعت و P میزان گاز تولیدی (میلی-لیتر) در زمان مورد نظر است. قابلیت هضم ماده آلی بر اساس روش Menke *et al.* (1979) (رابطه ۱) و انرژی قابل متابولیسم بر اساس روش Menke and Staingass (1988) (رابطه ۲) و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از روش Makkar (2005) (رابطه ۳) تخمین زده شدند.

رابطه (۱)

$$OMD (\%) = 14.88 + 0.889GP + 0.45CP1 + 0.065Ash$$

رابطه (۲)

$$ME (Mj/kg\ DM) = 2.20 + 0.136GP + 0.057CP2 + 0.00029CF$$

رابطه (۳)

$$SCFA (mmol) = 0.0222GP - 0.00425$$

در این معادلات، GP تولید خالص گاز در ۲۴ ساعت (میلی-لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، CP_1 پروتئین خام (بر حسب درصد)، Ash مقدار خاکستر و CP_2 پروتئین خام (گرم بر کیلوگرم ماده خشک) است.

اندازه‌گیری قابلیت هضم، جمعیت پروتوزوا و برآورد تولید متان در شرایط آزمایشگاهی: اندازه‌گیری قابلیت هضم تیمارهای مختلف بر اساس روش کشت بسته انجام شد (Theodore *et al.*, 1994). روش تهیه بزاق مصنوعی و جمع‌آوری مایع شکمبه مطابق آنچه در آزمون تولید گاز شرح داده شد، صورت گرفت. pH مخلوط بافر و مایع شکمبه به وسیله دستگاه pHمتر الکترونیکی (مدل ۶۹۱، شرکت Metrohm) کنترل و روی ۶/۸ تنظیم شد. میزان ۵۰ میلی‌لیتر از بزاق مصنوعی تهیه شده به داخل ویال‌های شیشه‌ای حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم جیره پایه بر اساس ماده خشک ریخته شد. تیمار-های آزمایشی نیز مشابه با آزمایش قبلی بود. سپس سر ویال‌ها به کمک درپوش پلاستیکی و پوشش آلومینیومی به-طور کامل بسته و در بن‌ماری با دمای ۳۸/۶ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت برای انکوباسیون قرار داده شد. در پایان مدت انکوباسیون، شیشه‌ها از بن‌ماری خارج و pH نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی، مقدار ۵ میلی‌لیتر از مایع شکمبه گرفته شد و با مقدار مساوی اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال، اسیدی و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه با روش فنل– هیپوکلرایت اندازه‌گیری شد (Broderik and Kang, 1980). برای محاسبه ناپدید شدن ماده خشک، محتوای بطری‌ها با پارچه با منافذ ۴۲ میکرومتر صاف و باقی‌مانده آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در آون خشک و قابلیت هضم ظاهری ماده خشک محاسبه شد. سپس ماده خشک باقی‌مانده در داخل کوره با دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ ساعت قرار داده و خاکستر آن محاسبه شد. بازده تولید گاز (GP24) به صورت حجم گاز تولید شده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون تقسیم بر مقدار ماده خشک تجزیه شده واقعی (گرم) محاسبه شد (Makkar *et al.*, 2005). محاسبه توده میکروبی تولید شده با استفاده از معادله زیر انجام شد (Blummel and Becker, 1997):

رابطه (۴)

(PF-۲/۲) × حجم گاز تولیدی برای ۲۴ ساعت = توده میکروبی تولید شده (میلی‌گرم به ازاء گرم ماده خشک).

PF (عامل تفکیک) بنا به تعریف برابر با نسبت میلی‌گرم ماده آلی حقیقی هضم شده بر میلی‌لیتر حجم گاز خالص تولیدی است. بازده توده میکروبی با تقسیم توده میکروبی تولید شده بر مقدار ماده آلی حقیقی قابل تخمیر در پایان زمان انکوباسیون (۲۴ ساعت) محاسبه شد.

برآورد تولید گاز متان: برای برآورد تولید گاز متان تیمارهای مختلف، از روش آزمون تولید متان استفاده شد (Fievez *et al.*, 2005). تهیه محلول‌ها و آماده‌سازی نمونه‌ها طبق روش آزمون تولید گاز انجام گرفت، با این تفاوت که از بطری‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری و میزان ۱۲۵ میلی‌گرم نمونه استفاده شد. گاز تولید شده بعد از ۲۴ ساعت قرائت شد و سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱۰ نرمال با کمک سرنگ به داخل بطری‌ها تزریق شد و مجدداً مقدار گاز داخل هر بطری قرائت و در نهایت مقدار تولید گاز متان در ۲۴ ساعت برآورد شد.

شمارش پروتوزوآ: برای شمارش پروتوزوآ، محلول MFS (متیل گرین– فرمالین– سالین) تهیه شد. محلول MFS شامل ۱۰ میلی‌لیتر فرمالدئید ۳۵ درصد، ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۰۶ گرم متیل گرین و ۰/۸ گرم کلرید سدیم بود. سپس ۴ میلی‌لیتر از این محلول به یک میلی‌لیتر مایع شکمبه صاف شده اضافه شده و بعد از ۳۰ دقیقه شمارش پروتوزوآ به‌وسیله میکروسکوپ نوری و با لام نئوبار آینه‌دار (بر اساس شکل و اندازه و وجود یا عدم وجود صفحه اسکلتی) و بزرگنمایی ۴۰ × انجام شد (Dehority, 1993).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه داده‌های حاصل با رویه GLM نرم افزار آماری SAS (2003) نسخه ۹/۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای پنج درصد انجام شد. مدل آماری طرح به شرح زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$ رابطه (۵)

Y_{ij}= مقدار مشاهده در هر صفت

μ= میانگین کل

T_i= اثر تیمار

نتایج و بحث

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی در عصاره‌های الکلی: اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات فنل و فلاونوئید در عصاره‌های اتانولی، متانولی و مخلوط (اتانول + متانول) برمموم (جدول ۱) نشان داد که بین عصاره‌های استحصالی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. با این حال، به لحاظ عددی مقادیر محاسبه شده برای ترکیبات فنلی و فلاوونوئید در عصاره متانولی بالاتر بود. از آن جایی که هیچ یک از روش‌های رنگ‌سنجی نمی‌تواند همه انواع فلاوونوئیدها را شناسایی کند و در روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید تنها فلاون‌ها و فلاونول‌ها قادرند کمپلکس پایداری با آلومینیوم کلراید تشکیل دهند و از نظر کمّی اندازه‌گیری شوند (Chang *et al.*, 2002)، لذا می‌توان نتیجه گرفت میزان این گروه از فلاوونوئیدها در عصاره متانولی بالاتر از سایر عصاره‌ها است. برآورد ترکیبات فعال در برمموم می‌تواند برای ارزیابی کیفیت برمموم استفاده شود. میزان فنول و فلاوونوئیدها با توجه به پوشش گیاهی و عرض جغرافیایی مناطق مختلف تفاوت دارد. همچنین چگونگی برداشت و زمان برداشت متفاوت نیز در میزان فنل و فلاوونوئید برمموم مؤثر است (Mohammadzadeh *et al.*, 2007). بنا به گزارش Kolankaya *et al.* (2002) میزان فلاوونوئیدهای موجود در برمموم مهمترین عامل در تعیین کیفیت آن است.

جدول ۱- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی و فلاونوئید

Table 1. Measurement of phenol and flavonoid combinations

Combinations	Ethanol	Methanol	Mix	SE	*P* Value
Flavonoid (µl/ml)	0.21	0.25	0.23	0.016	0.32
Phenol (g/mg)	10.48	11.75	9.87	1.008	0.49

تأثیر افزودن عصاره الکلی بره‌موم بر فراسنجه‌های تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی: نتایج حاصل از افزودن سطوح مختلف عصاره الکلی بره‌موم بر فراسنجه‌های تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی (جدول ۱) نشان داد که افزودن عصاره الکلی بره‌موم تأثیر معنی‌داری بر پتانسیل تولید گاز داشت (P<۰/۰۵). هر چند در بین سطوح مختلف از روند خاصی تبعیت نمی‌کرد. با افزایش سطح عصاره متانولی بره‌موم، پتانسیل تولید گاز روند افزایشی داشت، هر چند با افزایش سطوح عصاره اتانولی و مخلوط اتانول و متانولی از روند خاصی تبعیت نمی‌کرد. بیشترین کاهش پتانسیل تولید گاز مربوط به تیمار عصاره متانولی ۲۵ میکرولیتر بود. از نظر فراسنجه‌های تخمینی تولید گاز نیز بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). از این نظر، تیمار دارای عصاره مخلوط اتانول و متانول با سطح ۲۰۰ میکرولیتر بالاترین مقدار انرژی قابل متابولیسم، قابلیت هضم ماده آلی و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر را داشت. در مقایسه با تیمار شاهد، تیمارهای دارای سطح ۲۵ میکرولیتر عصاره اتانولی و عصاره متانولی و سطح ۵۰ میکرولیتر عصاره مخلوط اتانول و متانول، انرژی قابل متابولیسم، قابلیت هضم ماده آلی و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر پایین‌تری داشتند. نتایج این مطالعه همسو با نتایج Morsy *et al*. (2011) بود که نشان دادند افزودن عصاره بره‌موم تأثیری بر تولید گاز نداشت، اما تولید متان را کاهش داد. با این حال در برخی از مطالعات، استفاده از عصاره بره‌موم در مقایسه با تیمار شاهد تولید گاز را در خوراک‌های الیافی کاهش داد (Stradiotti *et al*., 2004). برخی تحقیقات گزارش کردند که عصاره بره‌موم غلظت کل اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در گاو هلشتاین تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۶۵ درصد علوفه و ۳۵ درصد کنسانتره را افزایش داد (Stradiotti *et al*., 2004). از سوی دیگر این محققان گزارش کردند که نسبت مولار مقادیر اسیدهای چرب کوتاه زنجیر شکمبه‌ای با طرز عمل بره‌موم تغییر نکرده است. علاوه بر این، برخی محققان نشان دادند که مکمل‌سازی بره‌موم (تا ۶ گرم به ازای هر حیوان در روز) بر غلظت کل و انفرادی اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در بزهای شیری با جیره غذایی ۶۷ درصد علوفه و ۳۳ درصد کنسانتره تأثیری نداشت (Lana *et al*., 2007). دلیل اثر غیر مفید بره-موم بر اسیدهای چرب کوتاه زنجیر شکمبه‌ای ممکن است به علت فقدان اثر بازدارندگی آن‌ها بر پروتوزوآی مژک‌دار شکمبه باشد. تا به حال مطالعات اندکی در خصوص تأثیرات بره‌موم بر تولید گاز و تولید متان انجام شده است.

جدول ۲- تأثیر عصاره الکلی بره‌موم بر خصوصیات تولید گاز و فراسنجه‌های تخمینی در شرایط آزمایشگاهی

Table 2. Effect of alcoholic extract of propolis on *in vitro* gas production characteristics and estimated parameters

Treatments	b[1]	C[2]	SCFA[3]	OMD[4]	ME[5]
Control	409.60^{ab}	0.062^{ab}	1.31^{abc}	68.45^{abc}	10.30^{abc}
Ethanol extract 25 μl	410.25^{ab}	0.057^{b}	1.26^{cde}	66.20^{cde}	9.96^{cde}
Ethanol extract 50 μl	388.4^{cd}	0.063^{ab}	1.27^{bcde}	66.65^{cde}	10.03^{bcde}
Ethanol extract 100 μl	397.3^{bc}	0.064^{ab}	1.31^{abc}	68.45^{abc}	10.30^{abc}
Ethanol extract 200 μl	385.85^{cd}	0.069^{a}	1.30^{bcd}	68.00^{bcd}	10.23^{bcd}
Methanol extract 25 μl	365.60^{e}	0.069^{a}	1.23^{de}	65.30^{de}	9.82^{de}
Methanol extract 50 μl	390.30^{cd}	0.063^{ab}	1.29^{bcde}	67.55^{bcde}	10.16^{bcde}
Methanol extract 100 μl	410.05^{ab}	0.063^{ab}	1.33^{ab}	69.35^{ab}	10.43^{ab}
Methanol extract 200 μl	423.35^{a}	0.057^{b}	1.32^{abc}	68.90^{abc}	10.37^{abc}
Mix extract 25 μl	397.80^{bc}	0.065^{a}	1.32^{abc}	68.90^{abc}	10.37^{abc}
Mix extract 50 μl	376.65^{de}	0.061^{ab}	1.22^{e}	64.85^{e}	9.75^{e}
Mix extract 100 μl	380.05^{ed}	0.068^{a}	1.30^{bcd}	68.00^{bcd}	10.23^{bcd}
Mix extract 200 μl	410.40^{ab}	0.068^{a}	1. 38^{a}	71.15^{a}	10.75^{a}
SEM	4.53	0.002	0.021	0.854	0.133
P value	<0.01	0.03	<0.01	<0.01	0.01

1- Gas production potential (ml/g DM). 2- Gas production rate (ml/h). 3- Organic Matter Digestibility (%DM). 4- Metabolizable Energy (Mj/Kg DM). 5- Short Chain Fatty Acids (mmol).6- mean ±*SE*

Different superscript letters in the same column represent a significant difference (P<0.05)

تأثیر افزودن عصاره الکلی برهموم بر قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی: نتایج تأثیر افزودن سطوح مختلف عصاره الکلی برهموم بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی و فراسنجه‌های تخمیری در جدول ۳ نشان داد که تیمارهای دارای سطوح ۲۵ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی بالاترین و تیمار شاهد پایین‌ترین قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را داشتند (P<۰/۰۵). با این حال، بین سایر تیمارهای دارای عصاره با تیمار شاهد از نظر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. افزودن سطوح مختلف عصاره برهموم در مقایسه با تیمار شاهد از روند مشخصی تبعیت نکرد. با این حال، افزودن عصاره متانولی در سطح ۱۰۰ میکرولیتر منجر به بهبود معنی‌داری در عامل تفکیک، تولید پروتئین میکروبی و بازده تولید پروتئین میکروبی شد (P<۰/۰۵). تیمارهای دارای عصاره اتانولی و مخلوط (اتانول + متانول) با سطح ۲۰۰ میکرولیتر پایین‌ترین و تیمار دارای عصاره متانولی با سطوح ۲۵ و ۱۰۰ میکرولیتر بالاترین مقدار عامل تفکیک، توده میکروبی تولید شده و بازده تولید میکروبی را داشتند. در بین تیمارهای دارای عصاره اتانولی، متانولی و مخلوط (اتانول + متانول)، به‌نظر می‌رسد که افزودن عصاره متانولی بهبود بیشتری در فراسنجه‌های تخمیری ایجاد کرده است. به طور کلی نتایج حاکی از بهبود قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی در نتیجه افزودن عصاره برهموم در مقایسه با تیمار شاهد بود. همسو با نتایج این مطالعه، نشان داده شد که استفاده از عصاره اتانولی برهموم قهوه‌ای مصری و برهموم قرمز برزیلی منجر به بهبود غیر معنی‌دار در قابلیت هضم حقیقی ماده آلی می‌شود (Morsy *et al*., 2011). استفاده از سطوح ۲۵ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی بره-موم سبب افزایش معنی‌دار قابلیت هضم شد که به دنبال آن عامل تفکیک و تولید پروتئین میکروبی نیز به طور معنی-داری در این تیمارها بالاتر از تیمار شاهد بود. در مطالعه‌ای استفاده از سطوح مختلف عصاره اتانولی برهموم قهوه‌ای مصری و برهموم قرمز برزیلی تأثیر معنی‌داری بر عامل تفکیک نداشت. بهبود قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی با افزودن بره موم در این مطالعه بیانگر بهبود فرآیند تخمیر در شکمبه است. بخشی از این بهبود در قابلیت هضم می-تواند تا حدودی به خاطر تجزیه محصولات فلاوونوئیدهای برهموم باشد که قادر به متأثر ساختن قابلیت تجزیه‌پذیری الیاف هستند زیرا شکافت زنجیره باکتریایی آگلیکون فلاوونوئیدها، اسیدهای فنولیک مانند ۴،۳- دی هیدروکسی فنیل استیک را از ایزوکوئرسیترین و کوئرستین و یا اسید فنیل استیک را از نارینژنین تولید می‌کنند (Winter *et al*., 1989). برخی از این ترکیبات ساده فنولی ممکن است با بیوسنتز آمینواسیدهای آروماتیک تداخل داشته باشند. هر دو مسیر بیوسنتز از راه اسید سینامیک به هم مرتبط هستند. گزارش شده است که اسید فنیل پروپانوئیک و اسید فنیل استیک، تجزیه گلوکز و رشد چندین گونه از *Ruminococcus albus* را تسهیل و افزایش می‌دهند (Stack and Cotta, 1986). اطلاعات علمی مربوط به اثرات ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی مصنوعی و یا طبیعی در تخمیر شکمبه و رشد میکروبی بسیار اندک است (Cattani *et al*., 2012)، اما خواص آنتی‌اکسیدانی محتوای اصلی برهموم (فلاوونوئیدها، اسید پروپانوئیک و مدی‌کارپین) ممکن است چنین بهبودی را در روند تخمیر شکمبه توضیح دهد.

مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهند که برخی از آنتی-اکسیدان‌های طبیعی و سنتتیک با بهبود فعالیت و رشد میکروب‌های شکمبه، سبب هضم بهتر و افزایش بهره‌وری مصرف جیره غذایی می‌شوند (Jenkins *et al*., 2007). از آنجایی‌که میکروارگانیسم‌های شکمبه در مقایسه با میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری، به طور برجسته و به شدت با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کمتر توسعه یافته غیرهوازی هستند، احتمال می‌رود که افزودن آنتی-اکسیدان‌ها باعث کاهش تنش اکسایشی شوند و در نتیجه سبب ایجاد شرایط بهتر برای رشد میکروبی می‌شوند (Cattani *et al*., 2012). برخی محققان مشاهده کردند که اضافه کردن ۰/۰۵ میلی‌گرم بر گرم اتوکسی کوئین به جیره گاوهای شیری بهره‌وری شیر و همچنین هضم ماده خشک را بهبود می‌بخشد که اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیب را در تخمیر شکمبه نشان می‌دهد (Smith *et al*., 2002). با این حال تحقیقات بیشتری برای تأیید این فرضیه نیاز است.

عامل تفکیک که به عنوان شاخصی از راندمان ساخت توده میکروبی در شرایط برون‌تنی است (Blummel *et al*., 1997)

به صورت نسبتی از سوبسترای تجزیه شده به صورت حقیقی بر حسب میلی‌گرم به حجم گاز تولید شده در طول مدت انکوباسیون (۲۴ یا ۴۸ ساعت) تعریف می‌شود (Olivera, 1998). هر اندازه مقدار ضریب تفکیک بالا باشد نشان‌دهنده این است که ماده آلی تجزیه شده بیشتر به سمت تولید توده میکروبی رفته تا تولید اسیدهای چرب فرار.

از نظر pH و نیتروژن آمونیاکی بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. برخی مطالعات نشان دادند که سطوح افزایشی عصاره اتانولی برەموم و برەموم خام تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH ندارند (Morsy *et al*., 2011; Lana *et al*., 2007). همچنین گزارش دادند زمانی که مایع شکمبه با افزایش سطوح برەموم در دوره انکوباسیون (۲۴ ساعت) قرار می‌گیرند، غلظت‌های نیتروژن آمونیاکی در سطوح مختلف کاهش می‌یابد (Oeztuerk *et al*., 2010; Olivera, 1998). اطلاعات اندکی در مورد تأثیر برەموم بر باکتری‌های شکمبه‌ای وجود دارد. با این حال، اثر ضد باکتری برەموم بر گونه‌های مختلف باکتری به وسیله چندین محقق نشان داده شده است (Alencar *et al*., 2007). برەموم می‌تواند رشد باکتری‌های گرم مثبت را مهار کند و ممکن است یک افزودنی مفید برای اصلاح تخمیر میکروبی شکمبه باشد (Itavo *et al*., 2011).

تأثیر افزودن عصاره الکلی برەموم بر درصد گاز متان تولیدی و درصد کاهش متان در شرایط آزمایشگاهی: نتایج نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر کل گاز تولیدی، درصد متان و درصد کاهش گاز متان تولیدی (جدول ۴) اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). با افزایش سطح عصاره، مقدار تولید گاز از روند خاصی تبعیت نمی‌کرد، با این حال، پایین‌ترین درصد تولید گاز متان مربوط به تیمار دارای سطح ۲۰۰ میکرولیتر عصاره مخلوط اتانول- متانول بود. به طور کلی، در مقایسه با تیمار شاهد، افزودن عصاره برەموم (به جز سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی و ۵۰ میکرولیتر عصاره مخلوط) کاهش در مقدار تولید متان را سبب شد. درصد منفی پتانسیل کاهش گاز متان نشان‌دهنده این است که تولید متان در این تیمارها از مقدار تولید متان در تیمار شاهد بالاتر بوده است. در پژوهشی کاهش تولید متان تا ۲۶/۴ درصد در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم عصاره اتانولی برەموم قرمز برزیلی و قهوه‌ای مصری را گزارش کرده‌اند که این کاهش می‌تواند به علت اجزای اصلی ایزوفلاونوئیدها و اسیدهای چرب اشباع شده موجود در برەموم باشد (Morsy *et al*., 2011). برخی مطالعات پیشنهاد کردند که فعالیت فارماکولوژیکی اصلی برەموم می‌تواند به دلیل هیدرولیز فلاوونوئیدها به آگلیکون آزاد باشد که در شرایط کشت خالص بر ضد باکتری‌های گرم مثبت مؤثر است (Mirzoeva *et al*., 1997; Park *et al*., 1998). باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی آمونیاک، هیدروژن و لاکتات بیشتری تولید می‌کنند (Russel and Strobel, 1988)، در حالی که باکتری‌های گرم منفی اسید سوکسینیک تولید می‌کنند (Calsamiglia *et al*., 2007). اسیدهای چرب به عنوان سورفکتانت‌های آنیونی عمل می‌کنند و دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی هستند. این اسیدهای چرب اشباع شده می‌توانند با هدف قرار دادن ساختار و عملکرد دیواره‌های سلول‌های باکتریایی و غشاء، بر علیه ارگانیسم‌های گرم مثبت انتخاب شوند (Zhou *et al*., 2013). چندین مکانیسم فعالیت ضد باکتریایی اسیدهای چرب از قبیل مهار بازسازی ATP و نگهداری میزان pH در سراسر غشای سلولی باکتری‌های گرم مثبت گزارش شده که می‌تواند برەموم و اجزای آن را به عنوان یونوفری نظیر موننسین توصیف کند (Iwami *et al*., 1995).

تأثیر افزودن عصاره الکلی برەموم بر جمعیت پروتوزوآ شکمبه در شرایط آزمایشگاهی: نتایج حاصل از افزودن سطوح مختلف عصاره الکلی برەموم بر جمعیت پروتوزوآ شکمبه (جدول ۳) نشان داد که افزودن سطوح مختلف عصاره الکلی برەموم تأثیر معنی‌داری بر جمعیت گونه‌های مختلف پروتوزوآ شکمبه داشت (P<۰/۰۵). هر چند، این تأثیر با افزایش سطوح غلظتی عصاره‌های برەموم از روند خاصی تبعیت نمی‌کرد. بیشترین کاهش در غلظت هولوتریش‌ها در دوز غلظتی ۲۵ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره مخلوط اتانول و متانول مشاهده شد. نتایج این مطالعه همسو با نتایج Morsy (2015) *et al*. بود. در مطالعه‌ای نشان داده شد که عصاره برەموم تعداد پروتوزوآ در شکمبه گاومیش‌های تغذیه شده با جیره غذایی شامل علوفه تازه و کنسانتره با نسبت ۵۰:۵۰ را

کاهش داد، اما در گاوهای تغذیه شده با جیره مشابه این-گونه نبود (Rispoli *et al*., 2009). در مطالعه‌ای افزودن بره-موم (۰/۵ گرم در لیتر)، تعداد پروتوزوآی شکمبه را در سیستم تخمیری دو جریانه، به طور قابل توجهی تغییر نداد (Broudiscou *et al*., 2000). پروتوزوآی شکمبه‌ای سکونت-گاه حدود ۲۰ درصد از باکتری‌های تولید کننده متان بوده که درون و بیرون پروتوزوآ زندگی می‌کنند و مسئول تولید ۳۷ درصد از متان هستند. مهار پروتوزوآ می‌تواند سبب کاهش آزادسازی متان از راه جابجایی معادل آن از تولید متان به سنتز پروپیونات در شکمبه شود (Kreuzer *et al*., 1986). در مطالعه Morsy *et al*. (2015) نشان داده شد که عصاره بره‌موم باعث افزایش غلظت استات، پروپیونات، والرات و کل غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر شد. با در نظر گرفتن کلیه اثرات ذکر شده در مورد عصاره بره‌موم، به نظر می‌رسد بره‌موم باعث تحریک میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای مسئول مصرف هیدروژن می‌شود. چنین تغییری به لحاظ تغذیه‌ای برای متابولیسم انرژی شکمبه مفید خواهد بود زیرا پروپیونات یک اسید چرب کوتاه زنجیر گلوکوژنیک بوده که نسبت به دیگر اسیدهای چرب به طور مؤثرتری مورد استفاده نشخوارکنندگان قرار می‌گیرد (Brodiscou, 2000). در این مطالعه، تیمار دارای سطح ۲۰۰ میکرولیتر عصاره مخلوط اتانول و متانول کمترین تعداد هولوتریش‌ها را داشتند که همراه با بالاترین درصد کاهش در تولید متان همراه بود.

همواره خاصیت ضد باکتریایی در تمامی بره‌موم‌های مناطق مختلف وجود خواهد داشت زیرا بخشی از این خاصیت از راه زنبور عسل وارد بره‌موم می‌شود، ولی در مناطق مختلف جغرافیایی پوشش گیاهی بر میزان خاصیت ضد باکتریایی تأثیرگذار است (Bankova *et al*., 2000). نتایج نشان داده است که در کل، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری-های گرم منفی حساسیت بیشتری دارند. باکتری‌های گرم منفی علاوه بر لایه پپتیدوگلیکان، دارای یک غشای خارجی در دیواره سلولی خود هستند، سطح هیدروفیلی این غشاء که غنی از مولکول‌های لیپو پلی‌ساکاریدی است به عنوان مانع در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها عمل می‌کند. اما در مورد باکتری‌های گرم مثبت، مواد ضد میکروبی به راحتی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی را تخریب کرده که منجر به نشت سیتوپلاسم و انعقاد آن می‌شود (Duffy *et al*., 2001).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بره‌موم ممکن است یک افزودنی خوراکی مفید برای کاهش تولید متان، افزایش تخمیر میکروبی شکمبه و تجزیه‌پذیری جیره غذایی باشد. یافته‌های مشابه نشان می‌دهد که عصاره بره‌موم می‌تواند به-طور بالقوه به عنوان مکمل تغذیه‌ای بجای مونسین سدیم در جیره‌های غذایی بره‌های پرواری استفاده شود (Itavo *et al*., 2011). بنابراین، مطالعه حاضر استخراج ترکیبات فعال و اصلی بره‌موم را پیشنهاد می‌کند که تولید تجاری آن باید در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن بره‌موم توانایی کاهش پتانسیل تولید گاز را دارد، هر چند از حیث استفاده به صورت سطوح افزایشی از روند خاصی تبعیت نمی‌کرد. از نظر قابلیت هضم، افزودن عصاره الکلی بره‌موم به طور قابل ملاحظه‌ای قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را بهبود داد. در مقایسه با تیمار شاهد، تیمارهای دارای عصاره الکلی بره-موم عامل تفکیک و تولید پروتئین میکروبی بالاتری داشتند. روند کاهش تولید متان همراه با کاهش جمعیت پروتوزوا و به خصوص کاهش جمعیت هولوتریش‌ها بود. به هر حال، بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که عصاره الکلی بره‌موم توان تغییر فرآیندهای تخمیر شکمبه‌ای را دارد، هر چند آزمایشات بیشتری برای دست یافتن به جنبه-های مختلف تأثیر بره‌موم در اصلاح فرآیندهای تخمیر میکروبی شکمبه موردنیاز است.

جدول ۳- تأثیر عصاره الکلی بره‌موم بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی و فراسنجه های تخمیری شکمبه در شرایط آزمایشگاهی

Table 3. Effect of alcoholic propolis extract on *in vitro* DM and OM digestibility and ruminal fermentation perameters

Treatments	DMD[1]	OMD[2]	PF[3]	MCP[4]	EMCP[5]	GPE[6]	pH	NH_3-N[7]
Control	63.51[b]	64.52[b]	3.80[c]	163.90[c]	0.54[b]	198.54[a]	6.07	3.13
Ethanol extract 25 μl	68.00[ab]	68.09[ab]	4.51[abc]	192.40[abc]	0.60[ab]	170.59[ab]	6.04	4.28
Ethanol extract 50 μl	67.00[ab]	68.09[ab]	4.72[abc]	196.80[ab]	0.61[ab]	167.11[ab]	6.07	3.58
Ethanol extract 100 μl	66.00[ab]	67.02[ab]	4.57[abc]	190.70[abc]	0.60[ab]	171.42[ab]	6.07	3.34
Ethanol extract 200 μl	67.00[ab]	68.09[ab]	4.29[bc]	186.90[bc]	0.58[ab]	180.70[ab]	6.07	3.91
Methanol extract 25 μl	71.00[a]	71.27[a]	4.89[abc]	209.60[ab]	0.62[a]	160.48[b]	6.07	2.40
Methanol extract 50 μl	69.00[ab]	69.15[a]	5.20[ab]	216.20[ab]	0.64[a]	156.82[b]	6.05	5.11
Methanol extract 100 μl	71.00[a]	71.27[a]	5.70[a]	221.70[a]	0.66[a]	145.43[b]	6.06	2.93
Methanol extract 200 μl	68.00[ab]	68.09[ab]	4.30[bc]	186.90[bc]	0.58[ab]	177.94[ab]	6.05	3.19
Mix extract 25 μl	69.00[ab]	70.21[a]	4.86[abc]	205.70[ab]	0.62[a]	164.39[ab]	6.06	2.20
Mix extract 50 μl	67.00[ab]	69.15[a]	4.61[abc]	197.40[ab]	0.60[ab]	173.26[ab]	6.07	4.99
Mix extract 100 μl	69.00[ab]	70.21[a]	4.69[abc]	202.40[ab]	0.61[ab]	168.11[ab]	6.03	4.00
Mix extract 200 μl	68.00[ab]	69.15[a]	4.29[bc]	189.70[abc]	0.58[ab]	181.17[ab]	6.03	4.19
SEM	1.624	1.26	0.393	9.321	0.022	10.304	0.019	1.334
P value	0.02	0.04	0.02	0.05	0.01	0.02	0.74	0.95

1-*In Vitro* Dry Matter Digestibility(%), 2-*In Vitro* Organic Matter Digestibility(%),3- Partitioning Factor(mg/ml), 4- Microbial biomass(mg), 5- Efficiency of microbial biomass, 6- Gas Production Efficiency (ml/24h), 7-Non- Amonia Nitrogen (mg/dl)

Different superscript letters in the same column represent a significant difference (P <0.05)

جدول ۴- تأثیر عصاره الکلی بره‌موم بر کل گاز تولیدی (میلی‌لیتر به ازای ۱۲۵ میلی‌گرم ماده خشک)، درصد گاز متان تولیدی و درصد کاهش متان

Table 4. Effect of adding propolis extract on total gas production (ml/ 125 mg DM) methane concentration and methane production reduction potential (MRP)

Treatments	Total gas production (ml/125 mg DM)	Methane (%)	MRP (%)
Control	81.5[c]	25.61[abc]	-
Ethanol extract 25 μl	75.5[f]	21.72[bcd]	15.15[ab]
Ethanol extract 50 μl	69.5[g]	21.42[bcd]	16.29[ab]
Ethanol extract 100 μl	85.5[b]	27.32[ab]	-6.74[bc]
Ethanol extract 200 μl	82.0[c]	29.26[a]	-14.32[c]
Methanol extract 25 μl	77.5[e]	24.35[abc]	4.84[abc]
Methanol extract 50 μl	67.5[h]	21.32[bcd]	16.75[ab]
Methanol extract 100 μl	79.5[d]	20.62[bcd]	19.43[ab]
Methanol extract 200 μl	77.5[e]	19.23[cd]	24.87[a]
Mix extract 25 μl	63.5[i]	21.09[bcd]	17.60[ab]
Mix extract 50 μl	59.5[j]	29.16[a]	-13.93[c]
Mix extract 100 μl	89.5[a]	21.66[bcd]	15.36[ab]
Mix extract 200 μl	69.5[g]	18.00[d]	29.68[a]
SEM	0.48	2.008	8.048
P value	<0.01	0.02	0.01

MRP: Methane production reduction potential was calculated by (%Net methane in control - %Net methane in treatment)/(%Net methane in control)*100.

Different superscript letters in the same column represent a significant difference (P <0.05)

جدول ۵- تأثیر عصاره الکلی بره‌موم بر شمارش (×^{۵} ۱۰میلی‌لیتر) پروتوزوآی شکمبه

Table 5. Effect of alcoholic extract of propolis on the ruminal protozoa count (×10 ^{5}/ml)

Treatments	Genus				Total
	Halotrish	*Entodinium*	*Diplodinium*	*Efriuaskolos*	
Control	1.35^{bcd}	0.30^{ab}	0.10^{ab}	0	1.80^{abc}
Ethanol extract 25 μl	1.50^{abc}	0.20^{ab}	0.20^{ab}	0	1.90^{abc}
Ethanol extract 50 μl	1.85^{ab}	0.25^{ab}	0.20^{ab}	0	2.30^{ab}
Ethanol extract 100 μl	2.15^{a}	0.30^{ab}	0.35^{ab}	0	2.80^{a}
Ethanol extract 200 μl	1.70^{abc}	0.05^{b}	0.10^{ab}	0	1.85^{abc}
Methanol extract 25 μl	1.10^{dc}	0.05^{b}	0^{b}	0	1.15^{c}
Methanol extract 50 μl	1.40^{bcd}	0.15^{ab}	0.25^{ab}	0	1.80^{abc}
Methanol extract 100 μl	1.15^{cd}	0.15^{ab}	0.15^{ab}	0	1.45^{bc}
Methanol extract 200 μl	1.55^{abc}	0.20^{ab}	0.10^{ab}	0	1.85^{abc}
Mix extract 25 μl	0.75^{d}	0.55^{a}	0.15^{ab}	0	1.45^{bc}
Mix extract 50 μl	1.35^{bcd}	0.25^{ab}	0.40^{a}	0	2.00^{abc}
Mix extract 100 μl	1.15^{cd}	0.20^{ab}	0.30^{ab}	0	1.65^{bc}
Mix extract 200 μl	0.75^{d}	0.50^{a}	0.30^{ab}	0	1.55^{bc}
SEM	0.207	0.127	0.109	0	0.306
P value	<0.01	0.23	0.38	0	0.09

Different superscript letters in the same column represent a significant difference (P <0.05)

فهرست منابع

Alencar S. M., Oldoni T. L. C., Castro M. L., Cabral I. S. R., Costa-Neto C. M., Cury J. A., Rosalen P. L. and Ikegaki M. 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. Journal of Ethnopharma Cology, 113: 278-283.

Beuvink J. M. W. and Spoelstra S. F. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. Appllied Microbiology and Biotechnology, 37: 505-509.

Blümmel M., MakkarH. P. S. and BeckerK. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 77: 24-34.

Bonvehi J. S. and Coll F. V. 2000. Study on propolis quality from China and Uruguay. Zeitschrift für Naturforschung, 55 (9-10): 778-784.

Broudiscou L. P., Papon Y. and Broudiscou A. F. 2000. Effects of dry extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. Animal Feed Science and Technology, 87: 263-277.

Burdock G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of propolis. Food and Chemical Toxicology, 36: 341-363.

Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P. W., Castillejos L. and Ferret A. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science, 90: 2580-2595.

Cattani M., Franco T., Lucia B. and StefanoS. 2012. Synthetic and natural polyphenols with antioxidant properties stimulate rumen microbial growth *in vitro*. Animal Production Science, 52: 44-50.

Chung Y. H., Zhou M., Holtshausen L., Alexander T. W., Mcallister T. A., Guan L. L., Oba M. and Beauchemin K. A. 2012. Populations and enteric methane emissions. Journal of Dairy Science, 95: 1419-1427.

Cottica S. M., Sawaya A. C., Eberlin M. N., Franco S. L., Zeoula L. M. and Visentainer J. V. 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. Journal of the Brazilian Chemical Society, 22: 929-935.

Dehority B. A. 1993. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. CRC press, Inc, Boca Raton. FL.

Duffield F. T. and Bagg R. N. 2000. Use of ionofores in lactating dairy cattle: a review. Canadian Veteterinary Journal. Ottawa, 41: 388-394.

Duffy C. F. and Power R. F. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. Intrernational Journal of Antimicrobial Agents, 17: 527-529.

Fernandes L. B., Franzolin R., Franco A. V. M. and Carvalho G. 2008. Aditivos orgânicos no suplemento concentrado de bovinos de corte mant idos em pastagem. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 9: 231-238.

Fievez V., Babayemi O. J. and Demeyer D. 2005. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acids production that requires minimal laboratory facilities. Animal Feed Science and Technology, 123-124: 197-210.

Giannenas I., Skoufos J., Giannakopoulos C., Wiemann M., Gortzi O., lalas S. and Kyriazakis I. 2011. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. Journal of Dairy Science, 94: 5569-5577.

Guan H., Wittenberg K. M., Ominski K. H., Krause D. O. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. Journal of Animal Science, 84: 1896-1906.

Itavo C. C. B. F., Morais M. G., Costa C., Itavo L. C. V., Franco G. L., Silva J. A., Reis F. A. 2011. Addition of propolis or monensin in the diet: Behavior and productivity of lambs in feedlot. Animal Feed Science and Technology, 165: 161-166.

Iwami Y., Schachtele C. F. and Yamada T. 1995. Effect of sucrose monolaurate on acid production, levels of glycolytic intermediates, and enzyme activities of *Streptococcus mutans* NCTC 10449. Journal of Dental Research, 74: 1613-1617.

Jenkins T. and Vazquez-Anon M. 2007. Effects of feeding oxidized fat with or without dietary antioxidants on nutrient digestibility microbial nitrogen and fatty acids metabolism. Journal of Dairy Science, 90: 4361-4367.

Khampa S. and Wanapat M. 2007. Manipulation of rumen fermentation with organic acids supplementation in ruminants raised in the tropics. Pakistan Journal of Nutrition, 6: 20-27.

Kolankaya D., Selmanglu G., OrkunK and Salih S. B. 2002. Protective effect of Turkish propolis on alcohol induced serum lipid changes and liver injury in male rats. Food Chemistry, 78: 213-217.

Kreuzer M., Kirchgessner M. and Muller H. L. 1986. Effect of defaunation on the loss of energy in wethers fed different quantities of cellulose and normal or steam flaked maize starch. Animal Feed Science and Technology, 16: 233-241.

Lana R. P., Camardelli M. M. L., Rodrigues M. T., Eifert E. C., Oliveira M. V. M., Stradiotti J. D. and Oliveira J. S. 2007. Soybean oil and propolis in the diets of dairy goats: intake of nutrients and ruminal metabolism. Revista Brasileira de Zootecnia, 36: 191-197.

Makkar H. P. S. 2005. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. Animal Feed Science and Technology, 123: 291-302.

Menke K. H., Salewski L. A., Steingass H., Fritz D. and Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. The Journal of Agricultural Science, 93: 217-222.

Mirzoeva O. K., Grishanin R. N. and Calder P. C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiological Research, 152: 239-246.

Mohammadzadeh S., Sharriatpanahi M., Hamedi M., Amanzadeh Y., Sadat Ebrahimi S. E. and Ostad S. N. 2007. Antioxidant power of Iranian propolis extract. Journal of the Food Chemistry, 103: 729-733.

Morsy A. S., Soltan Y. A., Elzaiat H. M., Sallam S. M. A., Alencar S. M., Louvandini H. and Abdalla A. L. 2011. Effect of two types of Brazilian propolis extracts on rumen gas and methane production and truly degradability *in vitro*. The Middle East and North Africa Journal of Animal Science, 4: 446-456.

Morsy A. S., Soltan Y. A. Sallamb S. M. A., Kreuzer M., Alencar A. S. and Abdall A. L. 2015. Comparison of the *in vitro* efficiency of supplementary bee propolis extracts of different origin in enhancing the ruminal degradability of organic matter and mitigating the formation of methane. Animal Feed Science and Technology, 199: 51-60.

Oeztuerk H. and Sagmanligil V. 2009. Role of live yeasts on rumen ecosystem. DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 116: 244-248.

Oezturk H., Pekcan M., Sireli M. and Fidanci U. R. 2010. Effects of propolis on *in vitro* rumen microbial fermentation. Ankara university veteriner fakültesi Dergisi, 57: 217-221.

Oliveira M. V. M., Lana R. P., Eifert E. C., Luz D. F., Pereira J. C., Perez J. R. O. and Vargas J. R. F. M. 2007. Effect of monensin on intake and apparent digestibility of nutrients in sheep fed diets with different crude protein levels. Revista Brasileira de Zootecnia, 36: 643-651.

Olivera M. P. 1998. Use of *in vitro* gas production technique to assess the contribution of both soluble and insoluble fraction on the nutritive value of forage. MSc Thesis. University of Aberdeen, Scotland.

Ørskov E. R. and McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal of Agriculture Science, 92: 499-503.

Park Y. K., Ikegaki M. and Abreu J. A. S. 1998. Estudo da preparação dos extratos de propolis e suas aplicações. Ciēncia e Tecnologia de Alimentos, 18: 313-318.

Rispoli T. B., Rodrigues I. L., Martinsneto R. G., Kazama R., Prado O. P. P., Zeoula L. M. and Arcuri P. B. 2009. Ruminal ciliate protozoa of cattle and buffalo fed on diet supplemented with monensin or extracts from propolis. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 44: 92-97.

Russell J. B. and Strobel H. J. 1988. Effect of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. Journal of Animal Science, 66: 552-558.

Sallam S. M., Abdelgaleil A. S., Bueno A. M., Nasser I. C. S., Araujo M. E. A., R. C. and Abdalla A. L. 2011. Effect of some essential oils on *in vitro* methane emission. Archives of Animal Nutrition, 65: 203-214.

Seidel V., Peyfoon E., Watson D. G. and Fearnley J. 2008. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zone. Phytotherapy Research, 22: 1256-1263.

Smith J. L., Sheffield L. G. and Saylor D. 2002. Impact of ethoxyquin on productivity of dairy cattle. Journal of Dairy Science, 85: 358.

Stack R. J. and Cotta M. A. 1986. Effect of 3-phenylpropanoic acid on growth of and cellulose utilization by cellulolytic ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 52: 209-210.

Stockdale C. R. and Gill H. S. 2011. Effect of duration and level of supplementation of diets of lactating dairy cows with selenized yeast on selenium concentrations in milk and blood after the withdrawal of supplementation. Journal of Dairy Science, 94: 2351-2359.

Stradiotti Junior D., Queiroz A. C., Lana R. P., Pacheco C. G., Eifert E. C. and Nunes P. M. M. 2004. Effect of the propolis on amino acids deamination and ruminal fermentation. Revista Brasileira de Zootecnia, 33: 1086-1092.

Stradiotti Junior D., Queiroz A. C., Lana R. P., Pacheco C. G., Camardelli M. M. L., Detmann E., Eifert E. C., Nunes P. M. M. and Oliveira M. V. M. 2004. Effect of the propolis on the *in vitro* fermentation of different feedstuffs by the technique of gas production. Revista Brasileira de Zootecnia, 33: 1093-1099.

Theodorou M. K., Williams B. A., Dhanoa M. S., McAllan A. B. and France J. 1994. A simple production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48: 185-197.

Ultee A. and Kets E. J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4606-4610.

Van Soest P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornel University Press, Ithaca, New York. 476 pp.

Winter J., Moore L. H., Dowell Junior V. R. and Bokkenheuser V. D. 1989. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 55: 1203-1208.

Zhou X., Meile L., Kreuzer M. and Zeitz J. O. 2013. The effect of saturated fatty acids on methanogenesis and cell viability of Methanobrevi bacter ruminantium. Archaea, http://dx.doi.org/10.1155/2013/106916.

Zhou J. H., Li Y., Zhao J., Xue X. F., Wu L. M. and Chen F. 2008. Geographical traceability of propolis by high-performance liquid-chromatography fingerprints. Food Chemistry, 108: 749-759.

Animal Production Research

Vol. 7, No. 4, 2018 (33-46)

University of Guilan

Effect of adding different levels of propolis extracts on digestibility, gas production and *in vitro* ruminal fermentation parameters

M. Iri[1], J. Bayatkouhsar[2*], F. Ghanbari[2], A. M. Gharehbash[2]

1. MSc. Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

(Received: 19-05-2018 – Accepted: 15-09-2018)

Abstract

A study was conducted to evaluate the effect of adding different levels of ethanol, methanol and their 50:50 (v/v) binary mixture of propolis extract on *in vitro* gas production parameters, dry matter and organic matter digestibility, protozoa counts and methane production in a completely randomized design. Crude propolis sample was collected from Ramian region and its extraction was taken by ethanol, methanol and their mixture. Experimental treatments were including: 1) control containing basal diet with forage: concentrate ratio of 50:50 (without any extract), treatments 2 till 5 (control treatment + 25, 50, 100, 200 μl levels of ethanol extract, respectively), treatments 6 to 9 (control treatment + levels 25, 50, 100, 200 μl of methanolic extract, respectively), treatments 10 to 13 (control treatment + 25, 50, 100, 200 µl levels of binary solvents mixture extract, respectively). Results showed that the highest and lowest potential gas productions were related to treatment containing 200 μl and 25 μl of methanolic extract, respectively (P<0.05). Treatment containing 200 μl of binary solvents mixture extract had the highest metabolizable energy, organic matter digestibility and short chain fatty acid concentration (P<0.05). There was significant difference between treatments on dry matter and organic matter digestibility (P<0.05). Hence, treatments containing 25 and 100 µl of methanolic extract had the highest and control treatment had the lowest dry matter and organic matter digestibility, respectively (P<0.05). Using 25 μl and 200 μl levels of binary solvents mixture extract reduced *Halotrish* more than other levels and other extract. However, treatments containing propolis extract reduced methane production remarkably. Generally, it can be concluded that propolis methanolic extract has potential to improve ruminal fermentation efficiency. However, more research is warranted to manipulate rumen microbial fermentation.

Keywords: Metabolizable energy, Gas production, *In vitro*, Propolis extract

[*]Corresponding author: javad_bayat@yahoo.com