

تأثیر افزودن منابع مختلف اسیدهای چرب بر فراسنجه‌های تخمیر و جمعیت میکروبی شکمبه در شرایط برون تنی

حامد خلیل‌وندی بهروزیار^۱، مهدی دهقان بنادکی^{۲*}، محمد غفارزاده^۳ و کامران رضایزدی^۴

۱. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲ و ۴. دانشیاران گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی

دانشگاه تهران، کرج

۳. استادیار گروه علوم و فناوری سیلیکون، پژوهشکده توسعه فرآیندهای شیمیایی، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۲۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۲۹)

چکیده

هدف از انجام این آزمایش بررسی تأثیر افزودن الگوهای مختلف اسیدهای چرب بر گوارش پذیری شکمبه‌ای مواد مغذی، برخی فراسنجه‌های شکمبه‌ای و جمعیت میکروبی شکمبه بر پایه استفاده از روش‌های مولکولی در شرایط برون تنی بود. به این منظور، روغن‌های مختلف به‌عنوان منابع اولئیک، لینولئیک، لینولنیک، دکوزاهگزانوئیک و ایکوزاپنتانوئیک استفاده شد. برای تأمین اسید پالمیتیک از یک مکمل تجاری (برگافت تی-۳۰۰) حاوی درصد بالایی از اسید پالمیتیک به‌صورت گلیسریدی استفاده شد. نتایج این بررسی نشان‌دهنده کاهش ضریب‌های گوارش پذیری و کاهش جمعیت شکمبه‌ای باکتری‌های سلولولایتیک، قارچ‌های بی‌هوازی و پروتوزوا در نتیجه افزودن منابع اسیدهای چرب غیراشباع بود ($P < 0/05$). روغن ماهی هم‌زمان با کاهش باکتری‌های سلولولایتیک سبب افزایش جمعیت باکتری‌های پروتوتلیک و آمیلولیتیک شد ($P < 0/05$). روغن نخل (پالم) باوجود کاهش برخی از باکتری‌های سلولولایتیک تأثیری بر ضریب‌های گوارش‌پذیری دیواره یاخته‌ای، مقدار و الگوی اسیدهای چرب فرار تولیدی نداشت ($P > 0/05$). همه منابع روغنی مورد استفاده به‌استثنای روغن نخل سبب کاهش معنی‌دار متانوژن‌ها نسبت به گروه شاهد شدند، درحالی‌که افزودن روغن نخل، سبب افزایش متانوژن‌ها شد ($P < 0/05$). منابع اسیدهای چرب غیراشباع از جمله روغن ماهی سبب کاهش جمعیت باکتری‌های مسئول در مراحل مختلف هیدروژنه کردن زیستی (بیوهیدروژناسیون) شدند ($P < 0/05$). افزودن منابع مختلف اسیدهای چرب غیراشباع سبب کاهش غلظت کل اسیدهای چرب فرار و اسید استیک شد. بیشترین میزان کاهش در غلظت اسیدهای چرب غیراشباع نسبت به گروه شاهد مربوط به روغن ماهی بود (۱۰۳/۹ در برابر ۷۴/۰ میلی‌مول در لیتر به ترتیب برای گروه شاهد و روغن ماهی).

واژه‌های کلیدی: RT-qPCR، اسیدهای چرب غیراشباع، اسیدهای چرب فرار، روغن ماهی، روغن نخل.

مقدمه

حیوانی نقشی بسیار بنیادین در تأمین نیازهای جامعه‌های انسانی دارند. توانایی نشخوارکنندگان در

نشخوارکنندگان به‌عنوان منابع مهم تأمین پروتئین

سبب تسهیل شرایط و رفع نیاز به سامانه‌های کشت بی‌هوای شده و امکان بررسی گونه‌های غیرقابل کشت را نیز فراهم کرده است.

هدف این بررسی ارزیابی تأثیر منابع مختلف چربی (با الگوهای متفاوت اسیدهای چرب) بر مجموعه متنوعی از ریزجانداران شکمبه شامل باکتری‌های سلولولایتیک، آمیلولایتیک و پروتئولایتیک، متانوژن‌ها و جمعیت قارچ‌های بی‌هوای، پروتوزوا و جمعیت کل باکتری‌ها بود. افزون بر این تأثیر منابع متفاوت روغن بر ضریب‌های گوارش‌پذیری برون‌تنی مواد مغذی و میزان تولید و الگوی اسیدهای چرب فرار بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت مشترک در بخش تغذیه گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران انجام شده است. همه حیوانات مورد استفاده در این آزمایش بر اساس راهنمای نگهداری و استفاده از حیوانات مزرعه‌ای در تحقیقات علوم دامی FASS (2010) نگهداری شده‌اند.

در این تحقیق از روغن ماهی، روغن بذرک (کتان)، روغن آفتابگردان، روغن کلزا و یک منبع تجاری روغن نخل (پالم) (برگافت تی-۳۰۰) به ترتیب برای تأمین ایکوزاپنتانویک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید، اسید لینولنیک، اسید لینولئیک، اسید اولئیک و اسید پالمیتیک استفاده شد. اسیدهای چرب در همه منابع مورد استفاده از نوع گلیسریدی بوده و به منظور تأمین پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان) مورد نیاز و ایجاد یکنواختی در میزان آن، ۵۰۰ واحد در میلیون پاداکسنده به ازای هر کیلوگرم روغن خام از منبع هیدروکسی تولن بوتیل استفاده شد. روغن ماهی مورد استفاده از شرکت آرد ماهی خزر، روغن آفتابگردان و کلزا از شرکت صنعتی بهشهر و روغن بذرک از استخراج روغن دانه بذرک آسیاب شده با استفاده از هگزان تهیه شد.

نگهداری برون‌تنی با مایع شکمبه

مایع شکمبه از سه رأس گاو هلشتاین چندبار

استفاده از مواد خشبی، باوجود جمعیت میکروبی فعال در شکمبه، را می‌توان مهم‌ترین برتری نشخوارکنندگان نسبت به حیوانات مزرعه‌ای تک‌معدده‌ای دانست (Van Soest, 1994). افزایش تقاضا برای مصرف محصولات دامی و تلاش در جهت افزایش بهره‌وری دام به منظور افزایش تولید به ازای هر رأس دام، سبب ایجاد پیچیدگی‌های فراوانی در زمینه تأمین نیازهای غذایی حیوانات نشخوارکننده شده است. در این میان اهمیت تأمین انرژی کافی و افزایش کارایی تولیدی و تولیدمثلی دام و گرایش جامعه‌های انسانی به افزایش مصرف اسیدهای چرب غیراشباع و کاهش مصرف اسیدهای چرب اشباع از منشا محصولات دامی مصرف این مواد را به امری پرهیزناپذیر تبدیل کرده است (Reynolds *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2008). در این میان، حفظ محیط فعال و کارآمد شکمبه هم‌زمان با استفاده از مکمل‌های چربی با توجه به اثرگذاری سمی برخی از اسیدهای چرب بر محیط شکمبه ضروری است (Chilliard *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 200). ریزجانداران (میکروارگانیسم‌های) شکمبه توانایی متفاوتی در استفاده از منابع مختلف انرژی و پروتئینی داشته و درجه آسیب‌پذیری متفاوتی در برابر انواع اسیدهای چرب دارند (Maia *et al.*, 2007). حفظ جمعیت فعال باکتریایی به‌ویژه باکتری‌های هضم‌کننده الیاف در شکمبه به‌عنوان چالشی بزرگ در استفاده از منابع مختلف چربی در جیره دام مورد توجه متخصصین تغذیه قرار گرفته است. باین‌حال، گزارش جامعی در زمینه تأثیر انواع منابع چربی بر جمعیت ریزجانداران مختلف شکمبه وجود ندارد. افزایش درک متخصصان تغذیه از تغییرات محتمل میکروبی دستگاه گوارش در نتیجه استفاده از منابع مختلف اسیدهای چرب می‌تواند امکان پیش‌بینی عملکرد دام در موارد مختلف را فراهم کرده و اهمیت انواع ریزجانداران شکمبه در فرآیندهای هضم را بیش‌ازپیش نمایان کند. توسعه روش‌های مولکولی و کاربرد آن‌ها در زمینه بررسی‌های جمعیتی ریزجانداران شکمبه در سال‌های اخیر افزون بر ایجاد امکان بررسی‌های دقیق‌تر، امکان بررسی گونه‌های بیشتری را بدون نیاز به کشت آن‌ها فراهم کرده و لذا

به‌منظور جدا شدن باکتری‌های متصل به الیاف و اطمینان از حضور همه ریزجانداران شکمبه در محیط کشت، در آغاز با استفاده از مخلوط‌کن به مدت دو دقیقه مخلوط (Bueno *et al.*, 2005) و آنگاه با استفاده از پارچه توری ۴ لایه صاف و در حمام آبی با دمای ۳۹ درجه سلسیوس، تحت جریان پیوسته CO₂ با دو برابر حجم از بافر مک دوگال (McDougall, 1948) مخلوط شد.

زایش‌کرده غیر شیرده مجهز به فیستولای شکمبه‌ای با میانگین وزنی 20 ± 680 کیلوگرم پس از طی دوره عادت‌پذیری و پیش از خوراک‌دهی صبح تهیه شد. خوراک حیوانات مورد آزمایش با نسبت علوفه به کنسانتره برابر با ۶۰ به ۴۰ درصد (CNCPS V5)، به میزان ۱۰ درصد بالاتر از سطح نگهداری در دو وعده برابر در ساعات ۸ صبح و ۱۶ عصر به حیوانات داده شد (جدول ۱). مایع شکمبه پس از انتقال به آزمایشگاه

جدول ۱. ترکیب جیره غذایی حیوانات فیستولادار مورد استفاده برای تهیه مایع شکمبه (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

Table 1. Diet composition for feeding fistulated animals used as rumen fluid donors (g/kg DM)

Feed Ingredient	Quantity	Feed Ingredient	Quantity
Alfalfa Hay	217.8	Wheat bran	45.3
Corn Silage	249.9	Rice bran	29.5
Wheat straw	132.3	Na- Bicarbonate	3.2
Beet pulp	28.4	CaCO ₃	4.9
Barley grain	99.8	Calcium, Phosphate-Di	0.8
Corn grain	28.4	Min-Vit Mix ¹	3.9
Wheat grain	48.8	White Salt	1.6
Canola meal	69.2		
Soybean meal	36.3		

* هر کیلوگرم مکمل شامل: ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃، ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین E،

۱۹۰۰۰۰ میلی‌گرم Ca، ۹۰۰۰۰ میلی‌گرم P، ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم Na، ۱۹۰۰۰ میلی‌گرم، ۳۰۰۰ میلی‌گرم Fe، ۳۰۰ میلی‌گرم Cu.

۲۰۰۰ میلی‌گرم Mn، ۳۰۰۰ میلی‌گرم Zn، ۱۰۰ میلی‌گرم Co، ۱۰۰ میلی‌گرم I، ۳۰۰۰ میلی‌گرم پاداکسنده (B.H.T)

* Each kg contained: Vit A, 500000IU; Vit D₃, 100000 IU; Vit E, 100mg; Ca, 190000mg; P, 90000mg; Na, 50000mg; Mg, 19000mg; Fe, 3000mg; Cu, 300mg; Mn, 2000mg; Zn, 3000mg; Co, 100mg; I 100mg; Se, 1mg; Antioxidant (B.H.T) 3000mg.

میلی‌گرم خوراک کامل (همسان با خوراک تغذیه‌شده به گاوهای فیستولادار) آسیاب‌شده با الک (میلی‌متری (Wiley Mill) (AbuGhazaleh & Jenkins, 2004). در نهایت ۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و بافر با نسبت حجمی ۱:۲ تحت جریان مداوم دی‌اکسید کربن در داخل هرکدام از فلاسک‌ها ریخته شده و در فلاسک‌ها پلمپ شد. نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در حمام آبی شیکردار در دمای ۳۹ درجه سلسیوس انجام شد. سه فلاسک به ازای هر مکمل در هر دوره به‌منظور تعیین ضریب‌های گوارش‌پذیری مواد مغذی و سه فلاسک برای تعیین فراسنجه‌های شکمبه‌ای اختصاص یافت. در تعیین ضریب‌های گوارش‌پذیری، مواد داخل فلاسک‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن ۴۱ بدون خاکستر جدا شده و به مدت ۴۸ ساعت در آن ۶۰°C برای تعیین میزان ماده خشک قرار گرفت (AOAC, 2000). به‌منظور تعیین ماده آلی از سوزاندن بقایای هضم در کوره الکتریکی (۴۵۰ درجه سلسیوس به مدت شش ساعت، AOAC, 2000) استفاده شد و

نگهداری (انکوباسیون) مایع شکمبه با روغن‌های مختلف مورد آزمایش بر پایه روش VanNevel & Demeyer (1996) و با اندکی تغییرات در روزهای انجام آزمون، نوع بافر، نسبت بافر به مایع شکمبه و مدت‌زمان نگهداری به شرح زیر صورت گرفت. نگهداری در دو دوره^۱ (دوران در روزهای مجزا) انجام‌شده و در هر دوره شش فلاسک (با ظرفیت ۱۰۰ میلی‌لیتر) برای هرکدام از مکمل‌ها اختصاص یافت. افزون بر این در هر دوره نگهداری، شش فلاسک حاوی مخلوط مایع شکمبه و بافر، مکمل‌های خوراکی و بدون مکمل چربی به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. به‌منظور تصحیح مواد خوراکی از منشأ مایع شکمبه انکوبه‌شده بر ضریب‌های گوارش‌پذیری، در هر دوره شش فلاسک که تنها حاوی مایع شکمبه و بافر بودند، به‌عنوان بلانک استفاده شدند. در هر فلاسک ۳۵ میلی‌گرم روغن از هرکدام از منابع، ۵۰۰

و برای هر مکمل چربی از سه تکرار استفاده شد. جدول ۳ نشان‌دهنده الگوی اسیدهای چرب در مکمل‌های مورد استفاده است.

استخراج DNA

بخشی از مایع شکمبه صاف‌شده، به منظور استخراج DNA ژنومی به یخ‌زن با دمای ۲۰- درجه سلسیوس انتقال یافت. استخراج DNA بر پایه روش Tajima *et al.* (2001) و Yang *et al.* (2009) و با اندکی تغییرات انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع شکمبه با ۱ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد CATB به همراه ۱ گرم گلوله سرامیکی با قطر میانگین ۱۰۰-۵۰ μm مخلوط شده و به مدت دو دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه در هم‌زن‌نایزر قرار گرفت. در نهایت کل مقادیر محلول مربوط به هر نمونه با هم مخلوط شده و به مدت ده دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به ظرف جدید انتقال یافته و با استفاده از فنول و کلروفرم استخراج شد. پس از سانتریفیوژ دوباره، مواد ژنتیکی با استفاده از اتانول مطلق سرد به میزان دو برابر حجمی به مدت دو ساعت در یخ قرار گرفته و به منظور رسوب DNA به مدت پانزده دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد (Yang *et al.*, 2009). مواد رسوب داده شده، با اتانول ۷۰ درصد شسته و پس از خشک شدن نسبی تحت خلأ، در محلول بافر Tris-EDTA سترون حل و با استفاده از DNase-free and RNase A (T1 فرآوری شده و با استفاده از سامانه خلص سازی DNA Clean and Concentrator™-25, ZYMO) فرآوری و (CORP. Irvine, USA RESEARCH) فرآوری و در نهایت با استفاده از بافر مخصوص پالایه شد. در نهایت DNA خلص شده به منظور تعیین غلظت و کیفیت با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر نانودراپ، Thermo Scientific) ارزیابی و تا زمان استفاده بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

افزایش با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

آغازگر (پرایمر)‌های مورد استفاده و مشخصات آن‌ها برای هر کدام از گروه‌ها و گونه‌های میکروبی در جدول ۲ آورده شده است. آغازگرهای مورد استفاده توسط شرکت سینا

اجزای دیواره یاخته‌ای (الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی) با استفاده از سدیم سولفیت و بدون استفاده از آنزیم آمیلاز مقاوم به حرارت در ترکیب شوینده خنثی (VanSoest *et al.*, 1991; ANKOM technologies)، تعیین و بر پایه مقادیر موجود در فلاسک‌های بلانک تصحیح شد. محتویات دیگر فلاسک‌ها با استفاده از توری چهار لایه صاف شده و سه نمونه ۱ میلی‌لیتر از هر فلاسک به منظور شمارش، پروتوزوا برداشته شده (نه تکرار به ازای هر تیمار) و برای تثبیت پروتوزوا با فرمالین ۵۰ درصد به نسبت ۱:۱ مخلوط و در دمای اتاق نگهداری شد. شمارش پروتوزواها با استفاده از میکروسکوپ نوری و لام مخصوص با رنگ‌آمیزی متیلن بلو انجام گرفت (Dehority, 2003). مایع شکمبه به منظور تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار پس از صاف کردن با توری چهار لایه با اسیدسولفوریک ۵۰ درصد (نسبت ۱ به ۵۰ اسیدسولفوریک به مایع شکمبه) با مخلوط و به مدت پانزده دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار از فام‌نگاری (کروماتوگرافی) گازی با ستون شیشه‌ای (۱/۶۵ متر×۴/۶ میلی‌متر) به روش Ottenstein & Batler (1971) استفاده شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی با روش تغییر یافته Broderick & Kang (1980) تعیین شد.

تعیین الگوی اسیدهای چرب

به منظور تهیه متیل استر اسیدهای چرب مکمل‌های چربی مورد استفاده در آزمایش از روش (Ichihara & Fukubayashi, 2010) و با استفاده از اسیدکلریدریک متانولی (HCl/MeOH) استفاده و از نونادکانوئیک اسید (C19:0) به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. تعیین الگوی اسیدهای چرب با استفاده از فام‌نگاری گازی Varian CP-3800 با شناساگر FID و ستون (100 m×250 μm×0.2 μm CP-Sil88) انجام و با استفاده از مخلوط استاندارد (GLC 463 reference mixture, <http://www.nu-chekprep.com>) شناسایی شد. برنامه دمایی ستون بر پایه Lee *et al.* (2005) انتخاب

ثانیه واسرشت‌سازی، به مدت سی ثانیه به‌منظور اتصال (بر پایه دمای اتصال گزارش‌شده در جدول ۲) و یک دقیقه در دمای 72°C به‌منظور بسط بود. در نهایت دما به مدت شش دقیقه در 72°C حفظ شده و پس‌از آن در 4°C قرار گرفت. محصولات PCR با استفاده از ژل ۲ درصد آگاروز و MeduriGreen با استفاده از سامانه الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت جدا شده و با استفاده از سامانه کیت استخراج DNA از ژل (QIAquick Gel Extraction Kit, 28704) استخراج شده و به‌منظور اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرها در افزایش، توالی‌یابی شدند. رقت‌های مختلف محصولات PCR استخراج‌شده از ژل و DNA استخراج‌شده به‌منظور تعیین کارایی در سامانه RT-qPCR استفاده شدند.

ژن ساخته شده و به‌منظور اطمینان از توالی آغازگر، همه آغازگرها توالی یابی شدند. به‌منظور بررسی اختصاصی بودن آغازگرها، DNA استخراج‌شده با استفاده از سامانه PCR (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) افزایش شدند. هر ۲۵ میکرو لیتر مخلوط PCR شامل $2/5$ میکرو لیتر بافر $10\times\text{PCR}$ دارای 1.5mM MgCl_2 ، 20 پیکومول از هر کدام از آغازگرها، 1 میکرو لیتر dNTP's شامل 50 میکرومول از هر کدام از داکسی‌نوکلئوزید تری فسفات‌ها، $2/5$ واحد TaqTM DNA polymerase و آب درجه خلوص PCR داشت. برنامه دمایی (simplified hot start) شامل 75°C به مدت دو دقیقه به‌منظور فعال‌سازی آنزیم، 95°C به مدت یک دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه و 40 دور شامل 95°C به مدت سی

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در افزایش ریزجانداران شکمبه

Table 2. Primer Design Characteristics used for PCR amplification of rumen microorganisms

	FO- Primer	RE- Primer	Annealing Temperature	Reference
Total bacteria	GTG STG CAY GGY TGT CGT CA	GAG GAA GGT GKG GAY AC GT	60	Maeda et al. (2003)
Total protozoa	CAYGTCTAAGTATAAATAACTAC	CTCTAGGTGATWWGRTTTAC	61	Sylvester et al. (2004)
Total fungi	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	60	Denmann & Mesweeney
Methanogens	CCGGAGATGGAACCTGAGAC	CGGCTCTGCCAGCTCTTATTC	60	Zhou et al. (2009)
F. succinogenes	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCTGAACTATC	62	Tajima et al. (2001)
R. albus	GTTTTAGGATTGTAACCTCTGTCTT	CCTAATATCTACGCATTTACCCGC	60	Potu et al. (2011)
R. flavefaciens	TCTGGAAACGGATGGTA	CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA	62	Koike & Kobayashi (2001)
A. lipolytica	TGGGTGTTAGAAATGGATTCC	CTCTCTGCACTCAAGAATT	59	Potu et al. (2011)
B. fibrisolvens	TAACATGAGTTTGATCCTGGCTC	CGTTACTACCCGTCCTGC	62	Potu et al. (2011)
B. proteoclasticus	TCCTAGTGTAGCGGTGAAATG	TTAGCGACGGCACTGAATGCCTAT	62	Potu et al. (2011)
M. elsdenii	GACCGAAACTGCGATGCTAGA	CGCCTCAGCGTCAGTTGTC	60	Ouwerkerk et al. (2002)
Prevotella spp.	CACGGTAAACGTGGAT	GGT CGG GTTGCA GAC C	57	Matsuki et al. (2002)
P. ruminicola	GGTTATCTTGAGTGAGTT	CTGATGGCAACTAAAGAA	55	Tajima et al. (2001)
S. ruminantium	TGCTAATACCGAATGTTG	TCCTGCACTCAAGAAAGA	53	Potu et al. (2011)
S. bovis	TGTTAGATGCTTGAAGGAGCAA	CGCCTTGGTGAGCCGTTA	60	Klieve et al. (2003)

از مخلوط DNA حاصل از تیمارهای مختلف در غلظت‌های مختلف به‌عنوان کالیبراتورهای بین دور استفاده شد. در هر دور افزون بر نمونه‌های مورد ارزیابی و واسنج (کالیبراتور)های مورد اشاره از سه تکرار NTC (Non-Template-Control) به‌منظور

افزایش با استفاده از RT-qPCR

افزایش DNA با استفاده از سامانه (Applied System) Biosystems® 7500 Real-Time PCR و با سه تکرار برای هر کدام از جفت آغازگرهای مورد بررسی انجام شد. افزون بر این در هر دور از نمونه‌های حاصل

شکمه به صورت نسبتی از جمعیت کل باکتری‌های شکمه تعیین شد (Total rumen bacterial 16S rDNA) بر این پایه جمعیت نسبی گروه‌های مختلف بر پایه مقادیر ΔCt (Ct باکتری مورد بررسی منهای Ct کل باکتری‌ها) و بر پایه معادله $2e^{-\Delta Ct}$ محاسبه شد (Denman & McSweeney, 2006). میزان تغییرات در جمعیت گروه‌های مختلف ریزجانداران شکمه در نتیجه افزودن انواع مختلف منابع روغنی بر پایه جمعیت گروه میکروبی مورد نظر نسبت به گروه کنترل بررسی شد. بدین منظور جمعیت میکروبی در هر گروه در تیمار کنترل برابر با صد در نظر گرفته شده و میزان تغییرات در هر کدام از گروه‌های میکروبی نسبت به گروه کنترل سنجیده شد. شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب نشان‌دهنده منحنی افزایش و منحنی‌های استاندارد و نقطه ذوب مربوط به افزایش رقت‌های مختلف کل باکتری‌های شکمه به عنوان نمونه است.

اطمینان از اختصاصی بودن واکنش‌ها استفاده شد. به منظور افزایش نمونه‌های DNA، از سامانه SYBR (Dynamo, Thermo Fischer green master mix Scientific) استفاده شد. هر ۲۰ میکرولیتر مخلوط PCR شامل ۲ میکرولیتر مخلوط آغازگر (۴ پیکومول بر میکرولیتر از هر آغازگر)، ۴ میکرولیتر آب با درجه خلوص PCR، ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR mix و ۴ میکرولیتر از محلول حاوی DNA بود. برنامه دمایی مورد استفاده شامل ۹۵°C به مدت ده دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه و چهل دور شامل ۹۵°C به مدت پانزده ثانیه، ۶۲-۵۳°C برای اتصال و یک دقیقه در دمای ۷۲°C به منظور بسط بود. منحنی‌های مربوط به Melting curves با افزایش دما به میزان ۰/۱°C/s از ۵۵°C به ۹۵°C با اندازه‌گیری مقادیر فلورسانس در هر ثانیه به دست آمد. این منحنی‌ها به منظور ارزیابی کیفیت و اختصاصی بودن فرآیند افزایش استفاده شد. جمعیت گروه‌های مختلف باکتری‌های

جدول ۳. الگوی اسیدهای چرب منابع مختلف چربی استفاده شده در آزمایش (گرم در ۱۰۰ گرم اسید چرب)

Table 3. Fatty acid profile of different fat supplements used in this study (g/100g of FA)

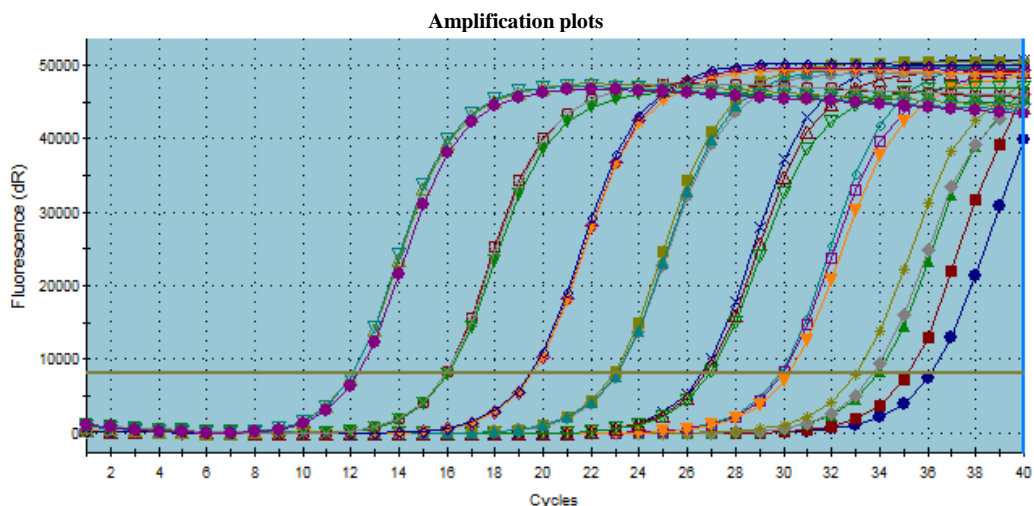
	Fish Oil	Sunflower Oil	Linseed Oil	Canola Oil	Palm Oil	S.E.M
12:0	0.131 ^d	0.354 ^b	0.563 ^a	0.261 ^c	0.005 ^e	0.045
14:0	1.126 ^a	0.126 ^b	0.264 ^b	0.423 ^{ab}	0.163 ^b	0.342
15:0	2.122 ^a	1.114 ^{ab}	0.577 ^b	1.842 ^{ab}	1.483 ^{ab}	0.643
16:0	3.119 ^{bc}	2.143 ^{bc}	1.352 ^c	4.163 ^b	77.591 ^a	0.942
16:1 cis-9	4.115 ^a	1.253 ^c	3.252 ^b	3.352 ^b	0.003 ^d	0.124
16:2	5.112 ^a	0.352 ^c	0.463 ^c	1.753 ^b	0.001 ^d	0.155
16:4n-3	6.108 ^a	0.375 ^c	0.251 ^d	1.621 ^b	0.178	0.185
17:0	7.105 ^a	2.311 ^b	2.116 ^b	2.114 ^b	1.273 ^c	0.215
18:0	8.101 ^b	7.463 ^b	5.251 ^c	11.352 ^a	8.152 ^d	0.365
18:1 cis-9	26.157 ^b	15.357 ^c	11.357 ^d	57.452 ^a	7.612 ^e	0.655
18:1 trans	1.415 ^b	0.275 ^c	0.024 ^d	2.358 ^a	ND	0.063
18:2n-4	0.369 ^c	0.251 ^d	1.241 ^b	2.542 ^a	0.127	0.016
18:2n-6	2.085 ^c	59.364 ^a	12.352 ^b	6.153 ^c	2.245 ^d	0.093
18:3n-3	2.531 ^d	8.114 ^b	55.164 ^a	3.176 ^c	0.125 ^e	0.097
18:4n-3	3.139 ^b	1.053 ^c	4.261 ^a	1.173 ^c	1.031	0.135
20:0	0.169 ^b	ND	0.352 ^a	ND	ND	0.017
20:1cis	1.246 ^a	ND	0.005 ^b	ND	ND	0.053
20:4n-3	0.887 ^c	ND	0.945 ^b	1.321 ^a	ND	0.038
20:4n-6	0.782	ND	ND	ND	ND	0.033
20:5n-3	0.897	ND	ND	ND	ND	0.378
22:1 cis	0.339	ND	ND	ND	ND	0.011
22:5n-3	1.735	ND	ND	ND	ND	0.072
22:6n-3	10.201	ND	ND	ND	ND	0.346
Other	2.110 ^a	0.113 ^b	0.212 ^b	0.012 ^c	0.021 ^c	0.334
SFA	21.872 ^b	13.511 ^c	10.457 ^d	20.155 ^b	88.667 ^a	0.694
MUFA	33.172 ^b	16.867 ^c	14.638 ^c	63.252 ^a	7.615 ^d	0.739
PUFA	41.849 ^c	69.157 ^b	74.677 ^a	17.739 ^d	3.707 ^e	0.854

میانگین‌های با بالانویس متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ است.

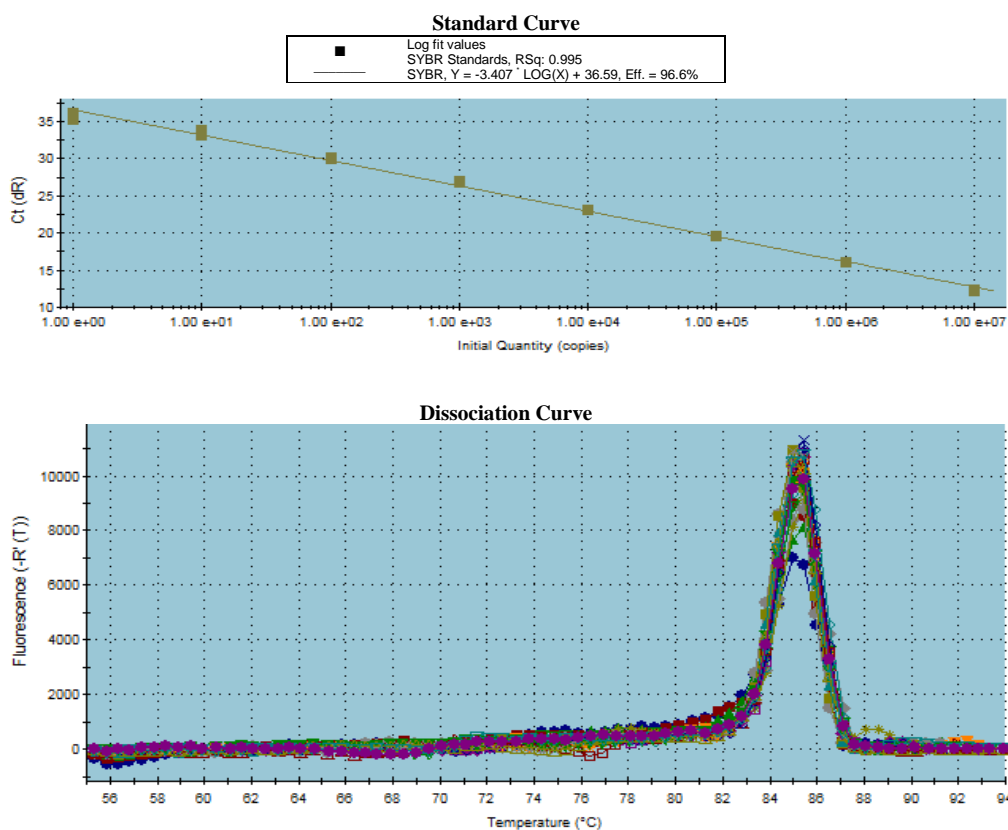
SFA: اسیدهای چرب اشباع؛ MUFA: اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه؛ PUFA: اسیدهای چرب با بیش از یک پیوند دوگانه.

Different letter in each row determines statistical difference (p<0.05).

SFA: Saturated Fatty acids; MUFA: MonoUnsaturated Fatty acids; PUFA: PolyUnsaturated Fatty acids.



شکل ۱. منحنی مربوط به افزایش رقت‌های مختلف جمعیت کل باکتری با استفاده از RT-qPCR
Figure 1. Amplification plot for amplification of bacterial DNA dilution series in RT-qPCR



شکل ۲. منحنی استاندارد و نقطه ذوب مربوط به افزایش رقت‌های مختلف جمعیت کل باکتری با استفاده از RT-qPCR
Figure 2. Standard curve for amplification of bacterial DNA dilution series in RT-qPCR

انجام شد در ارتباط با ضریب‌های گوارش‌پذیری و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، تأثیر روزهای مختلف انجام نگهداری (ران) در مدل آماری قرار گرفت. ولی به دلیل عدم معنی‌داری از مدل آماری حذف شده و

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به الگوی اسیدهای چرب و ترکیب جمعیتی ریزجانداران شکمبه بر پایه روش مولکولی به صورت طرح کامل تصادفی

الیاف در شکمبه باشد. در این تحقیق تأثیر انواع مکمل‌ها بر جمعیت میکروبی شکمبه در شکل‌های ۳ الی ۶ نشان داده شده است. کاهش باکتری‌های هضم‌کننده الیاف در این بررسی می‌تواند توجیهی بر کاهش گوارش‌پذیری شکمبه‌ای الیاف باشد. به نظر می‌رسد، اثرگذاری‌های متفاوت انواع اسیدهای چرب غیراشباع بر ضریب‌های گوارش‌پذیری را بتوان تحت تأثیر میزان غیراشباع بودن آن‌ها و اثرگذاری‌های متعاقب هر کدام از آن‌ها بر جمعیت میکروبی دستگاه گوارش دانست (Maia *et al.*, 2007; 2010). افزون بر این شاید سرعت و وسعت متفاوت هیدروژنه کردن زیستی (بیوهیدروژناسیون) انواع اسیدهای چرب در شکمبه هم بتواند توجیه‌کننده بخشی از این اثرگذاری باشد. بالاتر بودن میزان هیدروژنه کردن زیستی اسید لینولئیک و لینولنیک در مقایسه با روغن ماهی (Wachira *et al.*, 2000) که خود می‌تواند ناشی از گستره تأثیر اسیدهای چرب غیراشباع بر جمعیت میکروبی مسئول هیدروژنه کردن زیستی باشد (شکل ۵)، می‌تواند به عادی شدن سریع‌تر محیط شکمبه با از بین رفتن اسیدهای چرب غیراشباع منجر شده و در نهایت سبب کاهش اثرگذاری‌های منفی بر باکتری‌های سلولولایتیک و در نتیجه کاهش کمتر ضریب‌های گوارش‌پذیری دیواره یاخته‌ای منجر شود. تحقیقات پیشین نشان‌دهنده تأثیر سمی بیشتری از اسیدهای چرب غیراشباع بر ریزجانداران شکمبه در مقایسه با اسیدهای چرب اشباع بوده است. افزون بر این حساسیت گونه‌های مختلف میکروبی در برابر اسیدهای چرب غیراشباع نیز متفاوت بوده و برخی از گونه‌های میکروبی در شکمبه مقاومت بیشتری در این زمینه از خود نشان می‌دهند (Maia *et al.*, 2007; 2010).

جدول ۵ نشان‌دهنده اثرگذاری‌های افزودن منابع مختلف روغن بر میزان پروتوزوا، نیتروژن آمونیاکی و pH محیط کشت است. اسیدهای چرب غیراشباع سبب کاهش شدید جمعیت پروتوزوای شکمبه در مقایسه با گروه شاهد شدند، در حالی که افزودن روغن نخل تأثیر کمتری بر جمعیت پروتوزوا داشت. در این میان روغن کلزا سبب حفظ جمعیت بیشتری از پروتوزوا در مقایسه با روغن‌های غیراشباع‌تر شد. نتایج

داده‌ها به صورت طرح کامل تصادفی تجزیه و تحلیل شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از رویه خطی تعمیم‌یافته (PROC GLM) نرم‌افزار آماری SAS 9.1 (2003) انجام شد. مقایسه میانگین حداقل مربعات با استفاده از گزینه PDIF انجام شده و تصحیح آن‌ها با استفاده از آزمون توکی و با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

تأثیر افزودن انواع روغن‌ها بر ضریب‌های گوارش‌پذیری مواد مغذی در جدول ۴ نشان داده شده است. بیشترین تأثیر منفی بر ضریب‌های گوارش‌پذیری در ارتباط با الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی و در نتیجه استفاده از روغن ماهی بود. همه تیمارها به غیر از تیمار روغن نخل سبب کاهش ضریب‌های گوارش‌پذیری شدند. بیشترین میزان ضریب‌های گوارش‌پذیری مربوط به گروه کنترل بود ولی اختلاف معنی‌داری با روغن نخل وجود نداشت. در بین انواع منابع اسیدهای چرب ۱۸ کربنه غیراشباع، بیشترین تأثیر منفی مربوط به روغن کتان و کمترین میزان مربوط به روغن کلزا بود. گزارش‌های مختلفی در زمینه تأثیر منفی منابع اسیدهای چرب غیراشباع بر ضریب‌های گوارش‌پذیری ماده خشک و دیواره یاخته‌ای در محیط برون‌تنی و درون‌تنی، با بیان دلایل مختلفی همانند اثرگذاری‌های پوشانندگی چربی‌ها، کاهش تعداد و فعالیت باکتری‌های سلولولایتیک و ناتوانی در اتصال ریزجانداران به الیاف وجود دارد (Tamminga & Doreau, 1991; Doreau & Chilliard, 1997; Chalupa *et al.*, 1984). بررسی نمک‌های کلسیمی یا منابع پرپیل (فلیک) روغن نخل نشان‌دهنده نبود تأثیر منفی منابع روغنی حاوی غلظت‌های بالای اسیدپالمیتیک بر ضریب‌های گوارش‌پذیری مواد مغذی بود که با نتایج حاصل از این آزمایش همخوانی دارد (Grummer, 1988; Ganjkanloo *et al.*, 2010). به نظر می‌رسد، داشتن دمای ذوب بالاتر از دمای شکمبه و نبود امکان ایجاد پوشش روی الیاف، به عنوان یکی از مهم‌ترین دلایل بی‌تأثیر بودن این منابع بر ضریب‌های گوارش‌پذیری

PCR در ارتباط با تأثیر اسید پالمیتیک بر جمعیت پروتوزوا باشد. افزایش خطی سمیت اسیدهای چرب غیراشباع با افزایش درجه غیراشباع بودن را بر پروتوزوای شکمبه در این بررسی نشان داده و پیش‌تر نیز گزارش شده است (Oldick & Firkins, 2000).

این بررسی با نتایج Hristov *et al.* (2004) همخوانی دارد. در بررسی‌های مولکولی تأثیر منفی روغن نخل بر جمعیت پروتوزوا نیز مشاهده شد. دقت بالاتر روش‌های مولکولی نسبت به بررسی‌های میکروسکوپی می‌تواند دلیل ناهمخوانی داده‌های میکروسکوپی و

جدول ۴. میانگین ضریب‌های گوارش‌پذیری مواد مغذی در نتیجه افزودن منابع مختلف روغن در شرایط برون‌تنی

Table 4. Effects of different lipid sources on nutrient digestibility coefficients *in vitro*

Digestibility coefficients	Control	Fish Oil	Sunflower Oil	Linseed Oil	Canola Oil	Palm Oil	S.E.M
DM	73.48 a	58.89 d	65.11 b	62.11 c	66.53 b	72.11 a	1.432
OM	75.51 a	55.28 e	64.12 c	59.13 d	59.13 b	74.23 a	1.411
NDF	64.62 a	50.13 c	57.13 b	55.11 b	55.11 b	65.11 a	1.678
ADF	64.28 a	39.17 c	52.11 b	51.07 b	51.07 b	64.17 a	2.098

میانگین‌های با بالانویس متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ است.

Different letter in each row determines statistical difference ($p < 0.05$).

جدول ۵. اثر منابع مختلف مکمل چربی بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه در شرایط برون‌تنی

Table 5. Effects of different lipid sources on rumen fermentation parameters *in vitro*

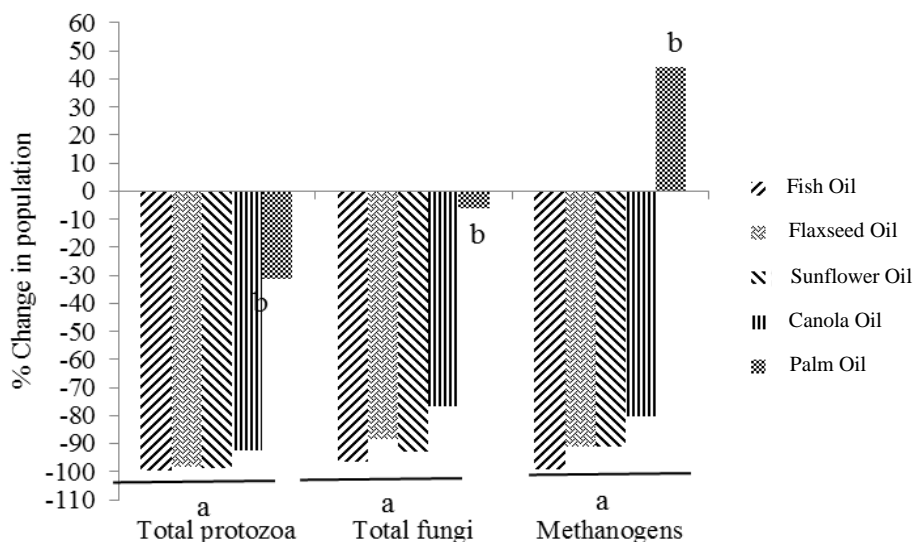
Ruminal Parameters	Control	Fish Oil	Sunflower Oil	Linseed Oil	Canola Oil	Palm Oil	S.E.M
pH	6.2 ^b	6.7 ^a	6.1 ^b	6.3 ^b	6.1 ^b	6.2 ^b	0.08
N-NH ₃ (mMol/ Lit)	19.5 ^c	25.7 ^a	23.11 ^b	22.14 ^b	19.7 ^c	19.3 ^c	0.47
Protozoa* ($\times 10^5$)	10.1 ^a	6.05 ^c	8.12 ^b	8.23 ^b	8.8 ^b	10.3 ^a	0.68

میانگین‌های با بالانویس متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ است.

* تعداد پروتوزوا در این جدول بر پایه نتایج به‌دست‌آمده از بررسی میکروسکوپی ارائه شده است.

Different letter in each row determines statistical difference ($p < 0.05$).

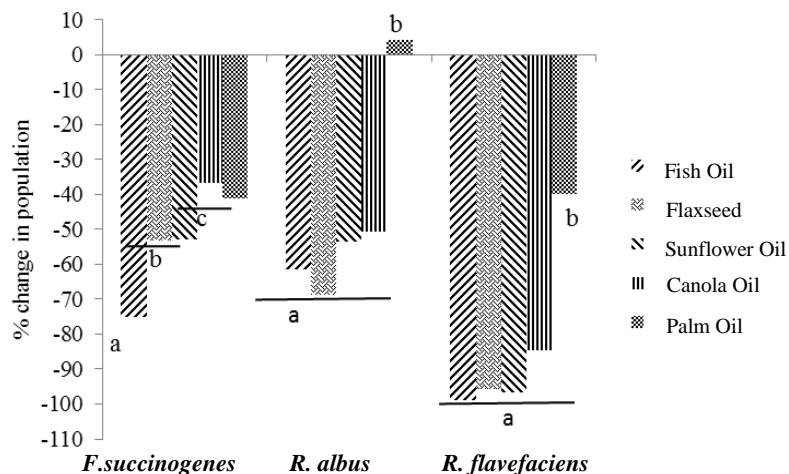
* Protozoa numbers were determined using microscopy



شکل ۳. تأثیر مکمل‌های روغنی مختلف بر درصد تغییرات جمعیت گونه‌های میکروبی در شکمبه نسبت به گروه شاهد.

میزان SEM به ترتیب برای پروتوزوا، قارچ‌ها و باکتری‌های متانوزن برابر با ۹/۲۱، ۶/۱۳ و ۱۰/۱۴ بود.

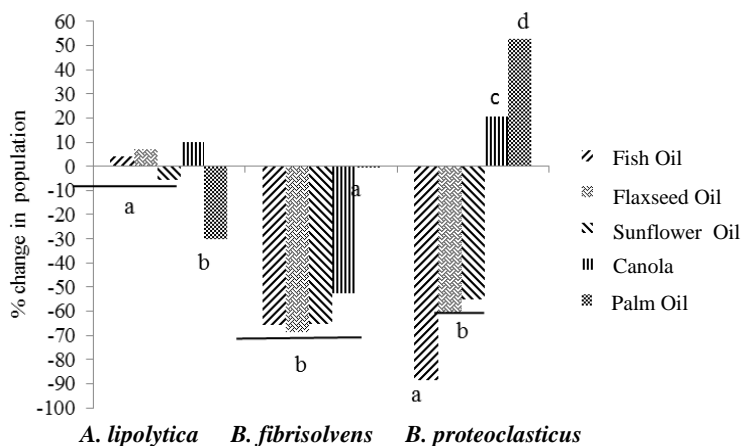
Figure 3. Effects of different oil sources on rumen microbial Population change (%) relative to control SEM was 9.21, 6.13 and 10.14 for Protozoa, Fungi and Methanogenic Archea, respectively.



شکل ۴. تأثیر مکمل‌های روغنی مختلف بر درصد تغییرات جمعیت گونه‌های مختلف میکروبی در شکمبه نسبت به گروه شاهد.

میزان SEM به ترتیب برای *F.succinogenes*، *R. albus* و *R. flavefaciens* برابر با ۵/۱۲، ۸/۳۵ و ۶/۳۲ بود.

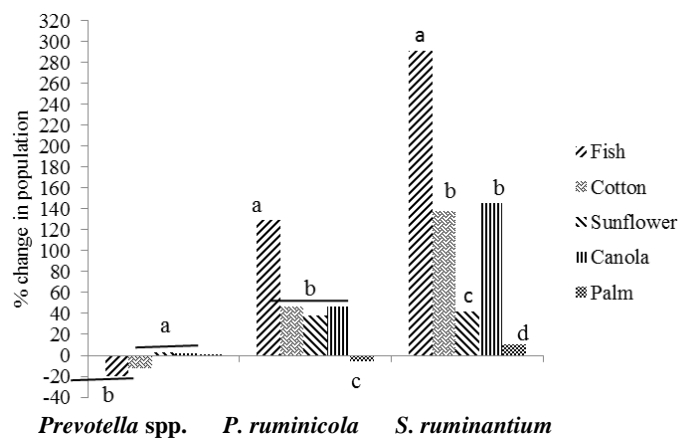
Figure 4. Effects of different oil sources on rumen microbial Population change (%) relative to control. SEM was 5.12, 8.35 and 6.32 for *F.succinogenes*, *R. albus* and *R. flavefaciens*, respectively.



شکل ۵. تأثیر مکمل‌های روغنی مختلف بر درصد تغییرات جمعیت گونه‌های مختلف میکروبی در شکمبه نسبت به گروه شاهد.

میزان SEM به ترتیب برای *A. lipolytica*، *B. fibrisolvens* و *B. proteoclasticus* برابر با ۴/۱۱، ۶/۱۷ و ۳/۱۵ بود.

Figure 5. Effects of different oil sources on rumen microbial Population change (%) relative to control. SEM was 4.11, 6.17 and 3.15 for *A. lipolytica*, *B. fibrisolvens* and *B. proteoclasticus*, respectively.



شکل ۶. تأثیر مکمل‌های روغنی مختلف بر درصد تغییرات جمعیت گونه‌های مختلف میکروبی در شکمبه نسبت به گروه شاهد.

میزان SEM به ترتیب برای *Prevotella spp.*، *P. ruminicola* و *S. ruminantium* برابر با ۴/۱۸ و ۵/۱۷، ۴/۱۵ بود.

Figure 6. Effects of different oil sources on rumen microbial Population change (%) relative to control. SEM was 4.11, 6.17 and 3.15 for *Prevotella spp.*، *P. ruminicola* and *S. ruminantium*, respectively.

باکتریایی توجیه کرد (Maia et al., 2007; Yang et al., 2009). گروه دریافت‌کننده روغن ماهی بیشترین میزان نیتروژن آمونیاکی، کمترین جمعیت پروتوزوا و بیشترین افزایش در جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک را داشت. باین‌حال توجه به این مطلب ضروری است که بخشی از اثرگذاری‌های روغن ماهی در بالاتر بودن غلظت نیتروژن آمونیاکی می‌تواند به دلیل کاهش بیشتر فعالیت‌های ساخت پروتئین میکروبی در نتیجه جلوگیری از رشد ریزجانداران شکمبه و در نتیجه کاهش استفاده شدن نیتروژن آمونیاکی در مسیر ساخت باشد. افزون بر این اطلاعاتی در زمینه تغییر در فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک مختلف در شکمبه در نتیجه افزودن منابع مختلف روغن وجود ندارد. بنابراین نمی‌توان به‌طور قطع افزایش در میزان DNA مربوط به باکتری‌های پروتئولیتیک را به افزایش در فعالیت تجزیه پروتئین نسبت داد و تعیین سهم هر کدام از عامل‌های افزایش در باکتری‌های پروتئولیتیک و یا کاهش استفاده از نیتروژن آمونیاکی در مسیر ساخت پروتئین میکروبی به‌عنوان دلایل افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی در نتیجه افزودن روغن ماهی، مستلزم انجام تحقیقات بیشتر است.

جدول ۶، نشان‌دهنده غلظت و الگوی اسیدهای چرب فرار تولیدی در شکمبه است. کاهش مقدار کل اسیدهای چرب فرار تولیدی در نتیجه استفاده از روغن‌های حاوی اسیدهای چرب غیراشباع را می‌توان نتیجه کاهش ضریب‌های گوارش‌پذیری دیواره یاخته‌ای با اثرگذاری‌های منفی روغن بر باکتری‌های سلولولایتیک دانست (Toral et al., 2010; Vlaeminck et al., 2008; Wachira et al., 2000; Fievez et al., 2003). افزایش غلظت مولی پروبیونات و کاهش استات در گروه‌های دریافت‌کننده روغن‌های غیراشباع نسبت به گروه کنترل و روغن نخل، نشانگر کاهش هضم الیاف بوده و نیز می‌تواند نشانه‌ای از کاهش تولید متان توسط این روغن‌ها باشد. مقادیر بوتیرات در گروه دریافت‌کننده روغن‌های غیراشباع کاهش و مقادیر ایزوبوتیرات، والرات و ایزوالرات افزایش یافت. (Vlaeminck et al., 2008). کاهش جمعیت قارچ‌های بی‌هوای در شکمبه و همچنین

بالاترین میزان pH شکمبه مربوط به گروه دریافت‌کننده روغن ماهی بود که می‌تواند به دلیل کاهش زیاد تولید اسیدهای چرب فرار در نتیجه کاهش ضریب‌های گوارش‌پذیری و اثرگذاری سمی اسیدهای چرب روغن ماهی بر ریزجانداران شکمبه باشد. تفاوت معنی‌داری بین pH گروه کنترل و دیگر گروه‌ها وجود نداشت. این امر ممکن است به دلیل بالاتر بودن میزان تولید اسیدهای چرب فرار در دیگر گروه‌ها در مقایسه با روغن ماهی باشد. باین‌حال بنا بر نتایج ارائه‌شده حاصل از بررسی‌های مولکولی، روغن ماهی و به میزان کمتر روغن کلزا و کتان سبب افزایش جمعیت باکتری‌های آمیلولیتیک و نیز افزایش نسبت اسیدپروپیونیک نسبت به گروه کنترل شدند. با در نظر گرفتن مجموع این عامل‌ها در کنار اثرگذاری این روغن‌ها بر کاهش جمعیت پروتوزوا و هضم سریع‌تر نشاسته در نتیجه از بین رفتن تأثیر بلع نشاسته توسط پروتوزوا، کاهش pH شکمبه می‌توانست مورد انتظار باشد. نتایج همسانی مبنی بر افزایش pH شکمبه هم‌زمان با افزایش سطوح روغن ماهی در جیره گزارش شده است (Shingfield et al., 2012). در بررسی Hristov et al. (2004) اسیدهای چرب کاپریک، لوریک و میرستیک که سبب از بین رفتن کامل پروتوزوا در محیط‌های کشت شده‌اند، سبب کاهش pH شکمبه شده‌اند. باین‌حال تفاوت در نوع مواد قابل‌دسترس برای تخمیر و خصوصیات بافری مناسب می‌تواند از جمله دلایل به دست آمدن این نتایج باشد.

باوجود کاهش جمعیت پروتوزوا، غلظت نیتروژن آمونیاکی در گروه دریافت‌کننده روغن ماهی، کتان و آفتابگردان نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که با نتایج Hristov et al. (2003) همخوانی داشت. با کاهش جمعیت پروتوزوا انتظار می‌رود با کاهش روی گرد پروتئین باکتریایی و کاهش آزادسازی خالص آمونیاک از منشأ پروتوزوا، غلظت نیتروژن آمونیاکی کاهش یابد (Doreau & Ferlay, 1995). باین‌حال می‌توان این پدیده را با افزایش باکتری‌های پروتئولیتیک در پاسخ به کاهش پروتوزوا و یا کاهش ساخت پروتئین میکروبی در نتیجه کاهش فعالیت‌های

باکتری‌های سلولولایتیک و یا هیدروژنه کردن زیستی سریع‌تر و بیشتر آن‌ها در نتیجه حفظ جمعیت بیشتری از باکتری‌های گروه *Butyrivibrio* نسبت به روغن ماهی باشد. این توجیه با تعداد باکتری‌های این گروه و نیز نتایج *Potu et al.* (2011) و *Maia et al.* (2007) در تعیین میزان سمیت انواع اسیدهای چرب بر گونه‌های مختلف ریزجانداران شکمبه همخوانی دارد. نتایج متفاوت مشاهده شده بین بررسی‌های مختلف را می‌توان بازتابی از مواد خوراکی متفاوت استفاده شده در آزمایش‌های مختلف به‌منظور تخمیر نیز دانست.

کاهش جمعیت باکتری‌های گروه *Butyrivibrio* را می‌توان از جمله دلایل کاهش غلظت بوتیرات دانست. بیشترین کاهش در غلظت اسیدهای چرب فرار و استات مربوط به گروه دریافت‌کننده روغن ماهی بود که با نتایج مربوط به ضریب‌های گوارش‌پذیری بسیار قابل توجیه است. کاهش کمتر ضریب‌های گوارش‌پذیری و غلظت اسیدهای چرب فرار در نتیجه افزودن روغن‌های حاوی اسیدهای چرب غیراشباع هجده کربنه در مقایسه با روغن ماهی می‌تواند به دلیل سمیت کمتر این اسیدهای چرب برای

جدول ۶. تأثیر منابع مختلف ماکمل چربی بر غلظت مجموع (میلی‌مول در لیتر) و الگوی (مول در ۱۰۰۰ مول) اسیدهای چرب فرار در مایع شکمبه

Table 6. Effects of different lipid sources on total VFA concentration (mM/L) and profile (mol/1000 mol) of rumen fluid *in vitro*

VFA Profiles	Control	Fish Oil	Sunflower Oil	Linseed Oil	Canola Oil	Palm Oil	S.E.M
Acetate	656.0 ^a	494.1 ^e	562.7 ^c	544.9 ^d	597.0 ^b	650.9 ^a	9.3
Propionate + IsoButyrate	215.1 ^d	418.8 ^a	332.1 ^b	235.8 ^b	285.0 ^c	212.0 ^d	3.8
Butyrate	110.3 ^a	63.68 ^d	86.7 ^c	93.7 ^{bc}	99.1 ^b	118.1 ^a	5.63
Valerate	13.31 ^b	16.6 ^a	14.06 ^{ab}	18.2 ^a	13.6 ^b	14.5 ^{ab}	2.21
Iso-Valerate	5.39 ^{ab}	6.72 ^a	4.24 ^b	7.10 ^a	5.30 ^{ab}	4.40 ^{ab}	0.929
Total VFA	103.9 ^a	74.0 ^d	83.2 ^c	82.1 ^c	91.4 ^b	104.2 ^a	2.93

میانگین‌های با بالانویس متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ است.

Different letter in each row determines statistical difference (p<0.05).

بررسی افزایش جمعیت برخی از گونه‌های پروتئولیتیک و آمیلولیتیک در کنار کاهش گونه‌های سلولولایتیک و *Butyrivibrio* می‌تواند با توجه به نسبت جمعیتی هر کدام از این گروه‌ها در بین کل باکتری‌های شکمبه، توجیه‌کننده بخشی از علل افزایش کل باکتری‌ها در کنار عامل‌های نام‌برده باشد.

اطلاعات بسیار کمی در زمینه تأثیر انواع اسیدهای چرب بر قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه وجود دارد. در یک بررسی حساسیت فوق‌العاده قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه در برابر اسیدهای چرب غیراشباع همانند حساسیت باکتری‌های سلولولایتیک گزارش شده است (*Maia et al.*, 2007). در این بررسی منابع اسیدهای چرب غیراشباع سبب کاهش بسیار شدید قارچ‌های شکمبه در مقایسه با گروه کنترل شدند ولی روغن نخل تأثیر معنی‌داری بر جمعیت قارچی شکمبه نسبت به کل باکتری‌های شکمبه نداشت. افزون بر این نشان داده شده است که عامل‌های کاهنده تولید متان در شکمبه، همانند ساپونین‌ها، هم‌زمان سبب کاهش شدید جمعیت

جدول ۷ نشان‌دهنده مقادیر حد آستانه (Ct value) مربوط به گروه‌های مختلف میکروبی است. افزودن روغن‌های حاوی اسیدهای چرب غیراشباع سبب افزایش معنی‌دار تعداد کل باکتری‌ها شد که این امر با توجه به کاهش Ct value قابل‌ملاحظه است. نتایج آزمایش *Yang et al.* (2009) در زمینه شمارش واحدهای تشکیل‌دهنده همسانه (کلونی) کل باکتری‌ها در نتیجه افزودن روغن کتان، سویا و مخلوط آن‌ها، نشان‌دهنده کاهش غیرمعنی‌دار باکتری‌های دارای قابلیت حیات در نتیجه استفاده از روغن نسبت به گروه کنترل است. نتایج این پژوهش می‌تواند به دلیل اثرگذاری‌های کاهنده آن‌ها بر جمعیت پروتوزوآ و قارچ‌های شکمبه و در نتیجه افزایش منابع غذایی و یا از بین رفتن محدودیت‌های اعمال‌شده دانست. این نتایج با نتایج *Goel et al.* (2008) در بررسی تأثیر انواع مواد ساپونین‌دار بر جمعیت میکروبی شکمبه همخوانی دارد. ساپونین‌ها همانند روغن‌ها سبب کاهش پروتوزوآ و قارچ‌های شکمبه می‌شوند. در این

شکمه داشته و می‌توان کاهش جمعیت قارچی در مایع شکمه را یکی از دلایل کاهش هضم دیوارهٔ یاخته‌ای و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و کاهش غلظت مولی استات و بوتیرات در این بررسی دانست.

قارچ‌های شکمه می‌شوند (Goel *et al.*, 2008). قارچ‌های بی‌هوازی شکمه با وجود جمعیت محدود که حداکثر کمتر از ۸ درصد زیست‌تودهٔ شکمه را تشکیل می‌دهند (Dehority, 2003)، نقش مؤثری در هضم الیاف در

جدول ۷. تأثیر افزودن روغن بر حد آستانه Ct گروه‌های مختلف ریزجانداران شکمه در RT-qPCR

Table 7. Effects of different lipid sources on RT-qPCR Ct values of different microbial populations

Desired Microbial Population	Control	Fish Oil	Sunflower Oil	Linseed Oil	Canola Oil	Palm Oil	S.E.M
Total bacteria	14.55 ^a	11.98 ^c	12.79 ^{bc}	12.95 ^b	13.73 ^b	14.31 ^a	0.351
Total protozoa	16.22 ^d	22.13 ^a	20.43 ^b	20.84 ^b	19.12 ^c	16.52 ^d	0.231
Total fungi	22.19 ^c	24.37 ^a	23.53 ^b	24.38 ^a	23.46 ^b	22.04 ^c	0.195
Methanogens	26.33 ^d	30.57 ^a	28.06 ^b	28.18 ^{bc}	27.85 ^c	25.56 ^d	0.475
<i>F. succinogenes</i>	18.43 ^b	17.86 ^c	17.76 ^c	17.91 ^c	18.27 ^b	18.95 ^a	0.163
<i>R. albus</i>	22.88 ^{ab}	21.68 ^b	22.79 ^{ab}	22.38 ^{ab}	23.08 ^a	22.58 ^{ab}	0.832
<i>R. flavefaciens</i>	22.56 ^e	26.31 ^a	25.29 ^b	25.82 ^b	24.45 ^c	23.05 ^d	0.234
<i>A. lipolytica</i>	29.99 ^a	27.36 ^b	28.13 ^{ab}	28.47 ^{ab}	29.03 ^a	30.27 ^a	0.853
<i>B. fibrisolvens</i>	21.35 ^{ab}	20.33 ^c	21.27 ^{ab}	21.27 ^{ab}	21.61 ^a	21.12 ^b	0.143
<i>B. proteoclasticus</i>	30.6 ^b	31.15 ^a	30.18 ^{bc}	20.15 ^{bc}	29.51 ^c	29.75 ^c	0.342
<i>M. elsdenii</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Prevotella spp.</i>	17.82 ^a	15.58 ^b	16.25 ^b	16.18 ^b	16.98 ^{ab}	17.57 ^a	0.512
<i>P. ruminicola</i>	20.93 ^a	17.16 ^d	18.62 ^c	18.86 ^c	19.56 ^b	20.78 ^a	0.211
<i>S. ruminantium</i>	24.52 ^a	19.98 ^d	21.51 ^c	22.41 ^b	22.43 ^b	24.14 ^a	0.157
<i>S. bovis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

میانگین‌های با بالانویس متفاوت در هر ردیف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ است.

Different letter in each row determines statistical difference ($p < 0.05$).
ND: Not detected.

قابل‌بیان باشد. ایجاد نشدن تأثیر پوشاندگی در الیاف توسط اسید پالمیتیک در مقایسه با اسیدهای چرب غیراشباع می‌تواند یکی دیگر از دلایل کاهش نیافتن ضریب‌های گوارش‌پذیری الیاف باوجود کاهش باکتری‌های سلولولولایتیک باشد. کاهش جمعیت باکتری‌های سلولولولایتیک در نتیجهٔ استفاده از اسید اولئیک توسط محققان گزارش شده است (Maczulak *et al.*, 1981). روغن سویا، کتان و مخلوط آن‌ها قادر به کاهش معنی‌دار هر سه باکتری مهم سلولولولایتیک در شکمه گزارش شدند (Yang *et al.*, 2009).
باین‌حال، تعیین جمعیت گونه‌های مختلف باکتریایی نمی‌تواند معیار صحیحی از میزان فعالیت آنزیم‌های تولیدشده توسط آن‌ها و میزان فعالیت آن‌ها باشد. افزایش فعالیت آنزیم‌های زیلاناز و کربوکسی‌متیل سلولاز در نتیجهٔ افزودن اسید لینولئیک، لینولئیک و اولئیک به مایع شکمه گزارش شده است (Hristov *et al.*, 2004). بنابراین می‌توان تغییرات در فعالیت آنزیمی به‌منظور جبران بخشی از کاهش در تعداد باکتری‌های سلولولولایتیک را در این تحقیق متصور بود.

جدول ۸ نشان‌دهندهٔ نتیجهٔ افزودن منابع مختلف روغنی بر جمعیت انواع ریزجانداران شکمه به‌صورت نسبی از کل باکتری‌های شکمه است. در میان اسیدهای چرب غیراشباع روغن ماهی سبب بیشترین میزان کاهش در جمعیت *F. succinogenes* شد. در این بررسی اسید لینولئیک و لینولئیک تأثیر مهمی کمتری داشتند که می‌تواند یکی از دلایل بالاتر بودن ضریب‌های گوارش‌پذیری دیوارهٔ یاخته‌ای نسبت به روغن ماهی باشد. اسید پالمیتیک نتیجهٔ معنی‌داری بر جمعیت *R. albus* در مقایسه با گروه کنترل نداشت ولی میزان دو گونهٔ مهم دیگر سلولولولایتیک را کاهش داد. درصد کاهش توسط روغن نخل به‌صورت معنی‌داری کمتر از اسیدهای چرب غیراشباع بود و روغن نخل سبب حفظ نسبت بالاتری از این باکتری‌ها نسبت به کل باکتری‌های شکمه شد. باین‌حال، ضریب‌های گوارش‌پذیری مواد مغذی مختلف از جمله دیوارهٔ یاخته‌ای تحت تأثیر قرار نگرفت. کاهش نیافتن قارچ‌های شکمه و *B. fibrisolvens* به‌عنوان یکی از باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ سلولوز می‌تواند یکی از دلایل

جدول ۸. تأثیر افزودن روغن بر ترکیب جمعیتی ریزجانداران شکمبه به صورت نسبی از کل جمعیت باکتری‌ها بر پایه سامانه RT-qPCR

Table 8. Effects of different lipid sources on RT-qPCR Ct proportions of different microbial populations as total bacterial count

Desired Microbial Population	Control	Fish Oil	Sunflower Oil	Linseed Oil	Canola Oil	Palm Oil	S.E.M
Total protozoa	3.14E-01 ^a	8.80E-04 ^f	5.01E-03 ^e	4.22E-03 ^d	2.38E-02 ^c	2.16E-01 ^b	3.14E-03
Total fungi	5.01E-03 ^a	1.86E-04 ^c	5.85E-04 ^c	3.62E-04 ^c	1.18E-03 ^b	4.71E-03 ^a	2.10E-04
Methanogens	2.84E-04 ^b	2.53E-06 ^d	2.53E-05 ^e	2.60E-05 ^e	5.62E-05 ^e	4.11E-04 ^a	1.40E-04
<i>F. succinogenes</i>	6.79E-02 ^a	1.70E-02 ^c	3.19E-02 ^b	3.21E-02 ^b	4.30E-02 ^b	4.01E-02 ^b	5.20E-03
<i>R. albus</i>	3.11E-03 ^a	1.20E-03 ^b	9.77E-04 ^c	1.45E-03 ^b	1.53E-03 ^b	3.24E-03 ^a	2.00E-04
<i>R. flavefaciens</i>	3.88E-03 ^a	4.86E-05 ^d	1.73E-04 ^c	1.34E-04 ^c	5.93E-04 ^c	2.34E-03 ^b	7.12E-05
<i>A. lipolytica</i>	2.25E-05 ^a	2.35E-05 ^a	2.41E-05 ^a	2.13E-05 ^a	2.48E-05 ^a	1.57E-05 ^b	2.31E-06
<i>B. fibrisolvans</i>	8.97E-03 ^a	3.06E-03 ^c	2.80E-03 ^d	3.13E-03 ^c	4.25E-03 ^b	8.91E-03 ^a	1.10E-04
<i>B. proteoclasticus</i>	1.47E-05 ^a	1.70E-06 ^c	5.82E-06 ^b	6.64E-06 ^b	1.78E-05 ^a	2.25E-05 ^a	2.00E-06
<i>Prevotella spp.</i>	1.04E-01 ^a	8.27E-02 ^b	9.10E-02 ^b	1.07E-01 ^a	1.05E-01 ^a	1.04E-01 ^a	4.37E-03
<i>P. ruminicola</i>	1.20E-02 ^c	2.76E-02 ^a	1.76E-02 ^b	1.66E-02 ^b	1.76E-02 ^b	1.13E-02 ^c	2.14E-03
<i>S. ruminantium</i>	9.97E-04 ^e	3.91E-03 ^a	2.37E-03 ^b	1.42E-03 ^c	2.46E-03 ^b	1.10E-03 ^d	1.20E-04

میانگین‌های با بالانویس متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ است.

Different letter in each row determines statistical difference (p<0.05).

کاهش نسبت استات و بوتیرات در مایع شکمبه در نتیجه افزودن اسیدهای چرب غیراشباع باشد.

افزودن منابع مختلف روغن‌های غیراشباع به مایع شکمبه سبب افزایش عددی و غیرمعنی‌دار غلظت DNA مربوط به *A. lipolytica* شد. کمترین افزایش مربوط به روغن ماهی بود. با این حال روغن آفتابگردان و نخل سبب کاهش جمعیت این باکتری نسبت به گروه کنترل شدند که روغن نخل تأثیر معنی‌دار داشت. در آزمایش‌های مختلف با منابع مختلف روغن‌های اشباع و غیراشباع تأثیری بر جمعیت این باکتری نداشت (Huws et al., 2010; Maia et al., 2007; Tajima et al., 2001; Potu et al., 2011).

افزایش جمعیت گونه‌های پروتئولیتیک در نتیجه مصرف منابع روغن غیراشباع پیشتر توسط Yang et al. (2009) گزارش و بخشی از دلایل احتمالی آن در بخش‌های پیشین این مقاله بررسی شده است. مقدار DNA مربوط به *M. elsdeni* به عنوان یک باکتری دخیل در فرآیند سوخت‌وساز نیتروژن کمتر از حد قابل تشخیص در این آزمایش بود. نتایج همسانی در زمینه جمعیت این باکتری در حالت مایع و جامد باکتری‌های شکمبه در محیط‌های کشت گراس و شبدر قرمز گزارش شده است (Huws et al., 2010). یکی دیگر از وظایف یادشده برای این باکتری مصرف اسیدلاکتیک در شرایط pH پایین شکمبه است. بنابراین بخشی از دلایل مربوط به تشخیص ندادن این باکتری را می‌توان به بالا بودن نسبی pH محیط و کاهش تولید اسیدلاکتیک به عنوان بستره مورد استفاده این باکتری

اسیدهای چرب غیراشباع سبب کاهش معنی‌دار جمعیت باکتری‌های مسئول هیدروژنه کردن زیستی نسبت به گروه کنترل شدند. اسید پالمیتیک تأثیری بر جمعیت دو گونه مورد بررسی از *Butyrivibrio* نداشت. در این بررسی *B. fibrisolvans* نسبت به *B. proteoclasticus* درصد بیشتری از کل باکتری‌های شکمبه را تشکیل دادند. بیشترین میزان کاهش در جمعیت *B. proteoclasticus* مربوط به روغن ماهی بود. در راستای نتایج این تحقیق، Maczulak et al. (1981) هیچ تأثیر مهمی از اسید استئاریک یا اسید پالمیتیک بر جمعیت *B. fibrisolvans* مشاهده نکردند. نتایج این بررسی در زمینه افزایش تأثیر منفی اسیدهای چرب غیراشباع بر جمعیت باکتری‌های مسئول فرآیند هیدروژنه کردن زیستی با نتایج Maia et al. (2010) که اسیدهای چرب غیراشباع تک و چند غیراشباع را بررسی کردند، همخوانی دارد. Yang et al. (2009) گزارش کرد که استفاده از روغن کتان، سویا و مخلوط آن‌ها سبب کاهش جمعیت *B. fibrisolvans* در شکمبه می‌شود. در بررسی مورد اشاره روغن کتان تأثیر بیشتری نسبت به روغن سویا داشت، که با نتایج این بررسی هم‌راستا است. در بررسی Potu et al. (2011) در محیط کشت پیوسته، روغن ماهی سبب کاهش غلظت DNA مربوط به *B. fibrisolvans* شد. ولی روغن سویا و اسیدهای چرب اشباع تأثیری بر آن نداشتند. این روند در ارتباط با *B. proteoclasticus* هم وجود داشت. بخشی از کاهش ضریب‌های گوارش‌پذیری دیواره یاخته‌ای و

محدود بر جمعیت میکروبی شکمبه، تأثیری بر ضریب‌های گوارش‌پذیری مواد مغذی از جمله الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی و اسیدهای چرب فرار تولیدی نداشته و می‌تواند به‌عنوان یک منبع چربی بدون تأثیر منفی بر محیط شکمبه و عملکرد ریزجانداران مختلف شکمبه استفاده شود. استفاده از منابع مختلف روغن به‌عنوان منبع انواع اسیدهای چرب غیراشباع سبب تغییرات وسیع در جمعیت میکروبی شکمبه و کاهش ضریب‌های گوارش‌پذیری الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی می‌شود. افزایش درجه غیراشباع بودن اسیدهای چرب در روغن‌ها (تعداد پیوندهای دوگانه) و افزایش نسبت اسیدهای چرب غیراشباع در ترکیب کل اسیدهای چرب سبب افزایش اثرگذاری‌های نامطلوب روغن‌های گیاهی محافظت‌نشده در شکمبه می‌شود. با توجه به موارد نام‌برده و گزارش‌های مختلف در زمینه هیدروژنه کردن زیستی وسیع اسیدهای چرب غیراشباع، نیاز به استفاده از روش‌های محافظتی در استفاده از اسیدهای چرب غیراشباع، به‌منظور بهره‌مندی از اثرگذاری‌های سودمند آن‌ها در سوخت‌وساز دام و تولید محصولات غذایی سالم و در عین حال پرهیز از تغییرات محیط شکمبه‌ای، بسیار مشهود است. با توجه به نتایج مشاهده‌شده در این آزمایش، تحقیقات بیشتر با استفاده از غلظت‌های بیشتر اسید پالمیتیک و شرایط درون‌تنی به‌منظور تأیید بی‌تأثیر بودن در محیط شکمبه ضرورت دارد.

سپاسگزاری

این پژوهش زیر پوشش حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۸۹۰۰۰۶۷۷ انجام شده است. از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه، دانشگاه تهران و پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران برای تأمین بخشی از هزینه‌های این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

نسبت داد. غلظت DNA مربوط به *Prevotella spp.* تحت تأثیر افزودن منابع مختلف روغن قرار نگرفت که با نتایج *Huws et al.* (2010) همخوانی دارد. با این حال افزودن روغن ماهی سبب بیشترین افزایش در جمعیت *P. ruminicola* به‌عنوان یک باکتری مهم در فرآیند تجزیه پروتئین در شکمبه شد. افزایش جمعیت این باکتری را می‌توان در راستای جبران کاهش پروتوزوآ دانست. افزون بر این باکتری‌های مختلف جنس *Butyrivibrio* افزون بر فعالیت در فرآیند هیدروژنه کردن زیستی، در فرآیند تجزیه پروتئین، نشاسته و دیواره یاخته‌ای نیز دخیل هستند. لذا کاهش در جمعیت این باکتری‌ها با افزودن روغن به محیط، می‌تواند محرک افزایش جمعیت دیگر گروه‌ها جهت انجام وظایف همسان شود. *P. ruminicola* افزون بر فعالیت پروتئولیتیکی فعالیت آمیلولیتیکی هم دارد، بنابراین افزایش جمعیت این باکتری هم‌زمان با افزایش در جمعیت *S. ruminantium* در گروه دریافت‌کننده روغن ماهی می‌تواند در نتیجه کاهش جمعیت باکتری‌های سلولولایتیک و در واقع به‌صورت غیرمستقیم در نتیجه رفع برخی محدودیت‌های بوم‌سازگانی (اکوسیستمی) بین باکتری‌های مختلف باشد (Kudo et al., 1987; Chen & Weimer, 2001). گزارشی مبنی بر تأثیر افزایشی روغن ماهی بر جمعیت *S. ruminantium* وجود دارد (Potu et al., 2011). نداشتن سمیت اسیدهای چرب غیراشباع بر *P. ruminicola* و *S. ruminantium* تأیید شده است (Maia et al., 2007). ندادن تشخیص *S. bovis* همسان با نتایج *Huws et al.* (2010) بود. استفاده از روغن سویا و کتان به ترتیب به‌عنوان منابع اسیدلینولیک و اسیدلینولیک در آزمایش *Yang et al.* (2009) تأثیر معنی‌داری بر جمعیت کل باکتری‌های آمیلولیتیک نداشت. با این حال روغن سویا و مخلوط روغن سویا و کتان سبب افزایش عددی تعداد باکتری‌های آمیلولیتیک شدند.

نتیجه‌گیری نهایی

روغن نخل به‌صورت پریل باوجود برخی اثرگذاری‌های

REFERENCES

1. AbuGhazaleh, A.A. & Jenkins, T.C. (2004). Short communication: Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *Journal of Dairy Science*, 87, 1047-1050.

2. Broderick, G.A. & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63, 64-75.
3. Chalupa, W., Rickabaugh, B., Kronfeld, D. & Sklan, S. D. (1984). Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 67, 1439-1444.
4. Chen, J. & Weimer, W. (2001). Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. *Microbiology*, 147, 21-30.
5. Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J. & Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 828-855.
6. Dehority, B. A. (2003). *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
7. Denman, S. E. & McSweeney C. S. (2006). Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 572-582.
8. Doreau, M. & Chilliard, Y. (1997). Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reproduction Nutrition Development*, 37, 113-124.
9. Doreau, M. & Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livestock Production Science*, 43, 97-110.
10. FASS. (2010). *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. 3rd rev. ed. Federation of Animal Sciences Societies Savoy, IL.
11. Fievez, V., Dohme, F., Danneels, M., Raes, K. & Demeyer, D. (2003). Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. *Animal Feed Science and Technology*, 104, 41-58.
12. Goel, G., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (2008). Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 770-777.
13. Grummer, R. R. (1988). Influence of prilled fat and calcium salt of palm oil fatty acids on ruminal fermentation and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science*, 71, 117-123.
14. Henderson, C. (1973). The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *Journal of Agricultural Science*, 81, 107-112.
15. Hristov, A. N., Ivan, M. & McAllister, T. A. (2004). In vitro effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high-concentrate, barley-based diet. *Journal of Animal Science*, 82, 2693-2704.
16. Hristov, A.N., Ivan, M., Neill, L. & McAllister, T.A. (2003). Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 105, 163-184.
17. Hristov, A. N., Grandeem, K. L., Ropp, J. K. & McGuire, M. A. (2004). Effect of sodium laurate on ruminal fermentation and utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 1820-1831.
18. Huws, S.A., Lee, M.R.F., Muetzel, S.M., Scott, M.B., Wallace, R.J. & Scollan, N.D. (2010). Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 396-407.
19. Ichihara, K. & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, 51, 635-640.
20. Jenkins, T. C. & Palmquist, D. L. (1984). Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *Journal of Dairy Science*, 67, 978-986.
21. Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J. & Mosley, E.E. (2008). Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86, 397-412.
22. Kudo, H., Cheng, K.J. & Costerton, J.W. (1987). Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the *in vitro* digestion of straw cellulose. *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 241-248.
23. Lee, M.R.F., Tweed, J.K.S., Moloney, A.P. & Scollan, N.D. (2005). The effects of fish oil supplementation on rumen metabolism and the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in beef steers given diets containing sunflower oil. *Journal of Animal Science*, 80, 361-367.
24. Maczulak, A.E., Dehority, B.A. & Palmquist, D.L. (1981). Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 856-862.
25. Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Bestwick, C.S., Richardson, A.J., McKain, N., Larson, T.R., Graham, I.A. & Wallace, R.J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, 10, 52-62.
26. Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L. & Wallace, R.J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 303-314.

27. McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemistry Journal*, 43, 99-109.
28. Oldick, B.S. & Firkins, J.L. (2000). Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. *Journal of Animal Science*, 78, 2412-2420.
29. Ottenstein, D.M. & Batler, D.A. (1971). Improved gas chromatography separation of free acids C2-C5 in dilute solution. *Analytical Chemistry*, 43, 952-955.
30. Potu, R. B., AbuGhazaleh, A. A., Hastings, D., Jones, K. & Ibrahim, S. A. (2011). The effect of lipid supplements on ruminal bacteria in continuous culture fermenters varies with the fatty acid composition. *Journal of Microbiology*, 49, 216-223.
31. Reynolds, C. K., Aikman, P. C., Lupoli, B., Humphries, D. J. & Beever, D. E. (2003). Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science*, 86, 1201-1217.
32. Santos, J. E. P., Bilby, T. R., Thatcher, W. W., Staples, C. R. & Silvestre, F. T. (2008). Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 23-30.
33. Shingfield, K. J., Kairenius, P., Arölä, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V., Griinari, J.M. & Wallace, R. J. (2012). Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *Journal of Nutrition*, 142, 1437-1448.
34. Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. & Benno, Y. (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2766-2774.
35. Tamminga, S. & Doreau, M. (1991). Lipids and rumen digestion. 151-160. In: Jouany J. P. (ed.): *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. INRA, Paris.
36. Toral, P.G., Shingfield, K.J., Hervás, G., Toivonen, V. & Frutos, P. (2010). Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *Journal of Dairy Science*, 93, 4804-4817.
37. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. (1991). Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
38. VanNevel, C.J. & Demeyer, D.I. (1996). Effect of pH on biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids and their Ca-salts by rumen microorganisms in vitro. *Archives of Animal Nutrition*, 49, 151-157.
39. Veira, D.M., Ivan, M. & Jui, P.Y. (1983). Rumen ciliate protozoa: effects on digestion in the stomach of sheep. *Journal of Dairy Science*, 66, 1015-1022.
40. Vlaeminck, B., Mengistu, G., Fievez, V., Jonge, L.d. & Dijkstra, J. (2008). Effect of in Vvtro docosaheaxaenoic acid supplementation to marine algae-adapted and unadapted rumen inoculum on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in freeze-dried grass. *Journal of Dairy Science*, 91, 1122-1132.
41. Wachira, A. M., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., Hallett, K., Enser, M. & Wood, J. D. (2000). Rumen biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids and their effects on microbial efficiency and nutrient digestibility in sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 135, 419-428.
42. Yang, S.L., Bu, D.P., Wang, J.Q., Hu, Z.Y., Li, D., Wei, H.Y., Zhou, L.Y. & Looor, J.J. (2009). Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal*, 3, 1562-1569.

Effects of different fatty acid supplements on rumen fermentation parameters and microbial population in vitro condition

Hamed Khalilvandi-Behroozyar¹, Mehdi Dehghan-Banadaky^{2*}, Mohammad Ghaffarzadeh³
and Kamran Rezayazdi²

1. Assitant Professor, Department of Animal Science, Agriculture Faculty, Urmia University, Iran

2. Associate Professors, Department of Animal Science, Agricultura Faculty, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assitant Professor, Silicon Science & Technology Department, Chemistry & Chemical Engeneering Research Institute of Iran

(Received: Sep. 16, 2014 - Accepted: Jan. 19, 2016)

ABSTRACT

The aim of this study was to determine effects of different fatty acid profiles on rumen digestion coefficients, some of rumen metabolism parameters and rumen microbial populations. Different oils were used as source of fatty acids such as, Oleic, Linoleic, Linolenic, DHA and EPA. Palmitic acid supplemented from a commercial product (BergaFat T-300) containing high Palmitic acid percentage. Results showed that supplementation of unsaturated fatty acids led to reduction in nutrient digestibility and rumen population of protozoa, anaerobic fungi and cellulolytic bacteria ($P<0.05$). Fish oil resulted in higher population of proteolytic and amilolytic bacteria in expense of cellulolytic and major biohydrogenating population ($P<0.05$). Palmitic acid source reduced population of two of major cellulolytic bacteria, but there were no effects on cell wall digestibility, total and profile of rumen VFA ($P>0.05$). All of the oil supplements except for Palmitic acid supplement reduced methanogeinic archaea ($P<0.05$). Unsaturated fatty acid sources including fish oil greatly reduced rumen biohydrogenating bacteria population ($P<0.05$). Rumen total VFA and acetate concentration but not propionate decrease as PUFA sources supplemented. Fish oil resulted in greatest reduction in VFA concentration compared with control (103.9 vs. 74.0 mM/L, respectively).

Keywords: Fish oil, palm oil, PUFA, RT-qPCR, VFA.