

## تأثیر پودر میوه عناب بر فراسنجه‌های تخمیری، جمعیت پروتوزوایی و تولید گاز متان به روش برون‌تنی

محمدابراهیم نوریان سرور<sup>۱\*</sup> و محمد مهدی معینی<sup>۲</sup>

۱ و ۲. استادیار و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۲۴)

### چکیده

در این آزمایش، تأثیر سطوح مختلف پودر میوه عناب (۰، ۳۰ و ۶۰ میلی گرم) بر فراسنجه‌های تخمیر، جمعیت پروتوزوایی کل و سه زیر خانواده *Ophryoscolecinae*، *Entodiniinae*، *Diplodiniinae* و یک خانواده *Isotrichidae* و تولید گاز متان در شرایط برون‌تنی در قالب یک طرح کامل تصادفی ارزیابی شد. افزودن پودر میوه عناب سبب کاهش سرعت تخمیر ( $P < 0/01$ ) و بهبود قابلیت (پتانسیل) تخمیر ( $a+b$ ) در هر دو سطح ۳۰ و ۶۰ میلی گرم عناب به میزان ۳ و ۶ درصد ( $P < 0/01$ ) شد. گاز کل تولید شده ۲۴ ساعت تحت تأثیر افزودنی قرار نگرفت ولی گاز متان بر اساس ماده خشک در هر دو سطح کاهش ( $P < 0/05$ ) داشت. نیتروژن آمونیاکی نیز در هر دو سطح پودر عناب به ترتیب به میزان ۲۰/۸۵ و ۴۳/۸۵ درصد کاهش ( $P < 0/01$ ) یافت. سطح ۶۰ میلی گرم پودر عناب سبب کاهش درصد استات ( $P < 0/05$ ) و افزایش پروپیونات ( $P < 0/05$ ) شد و نسبت استات به پروپیونات از ۲/۶ به ۲/۲ کاهش ( $P < 0/01$ ) یافت. جمعیت کل پروتوزوآ ( $P < 0/01$ ) و شمار زیر خانواده انتودینیینه ( $P < 0/05$ ) نیز کاهش یافت. هرچند که جمعیت افریواسکالاسینه افزایش داشت ( $P < 0/05$ ). نتایج کلی نشان داد که عناب توانایی بهبود قابلیت تخمیر تا ۶ درصد افزایش، کاهش گاز متان تا ۱۷/۴ درصد، کاهش نیتروژن آمونیاکی تا ۴۳/۸ درصد و کاهش نسبت استات به پروپیونات تا ضریب ۰/۲ و جمعیت پروتوزوایی کل را دارد.

**واژه‌های کلیدی:** پروتوزوآ، تخمیر شکمبه، تولید گاز، عناب، گوسفند، متان.

### مقدمه

متان ضمن هدرروی ۱۲-۲ درصدی انرژی خام جیره (Johnson & Johnson, 1995)؛ به‌عنوان یک گاز گلخانه‌ای در حجم‌های برابر، ۲۵ مرتبه مؤثرتر از گاز دی‌اکسید کربن در گرم کردن زمین است (Morgavi et al., 2010). لذا کنترل فرآیند متان‌زایی با هدف بهبود تغذیه دام و حفظ محیط‌زیست ضروری است. دفع نیتروژن منابع خوراکی در محیط از آلاینده‌های محیط‌زیست و افزایش نیتروژن آمونیاکی در شکمبه نیز سبب هدرروی منابع نیتروژنی جیره می‌شود (Bach et al., 2005). عناب با نام علمی *Ziziphus*

یکی از هدف‌های محققان تغذیه دام، تغییر بوم‌سازگان (اکوسیستم) میکروبی شکمبه برای بهبود بازده تبدیل غذای دام به تولیدات دامی است (Busquet et al., 2005). تولید اسیدهای چرب فرار در شکمبه به هنگام هضم غذا همراه با تولید هیدروژن به‌عنوان یک محصول میانی بوده که بخشی از راه واکنش‌های متان‌زایی (متانوژنسیس) در تولید متان (Morgavi et al., 2010) و بخشی نیز در فرآیند تولید پروپیونات مصرف می‌شود (Alemu et al., 2011). با تولید گاز

چای به روش برون تنی (Guo *et al.*, 2008) و همچنین ساپونین چای به روش درون تنی گوسفندان (Mao *et al.*, 2010) ضمن کاهش گاز متان، پروتوزوا و نیتروژن آمونیاکی، سبب بهبود تخمیر شده‌اند. استفاده از سیزده عصاره گیاهی حاوی فلاوونوئیدها در بررسی Broudiscou *et al.* (2000) تولید متان و در بررسی Abarghuei & Rouzbehan (2013) در شرایط برون تنی گوسفند استفاده از عصاره تفاله انگور (ترکیبات فنولیک و ساپونین) و Maldar *et al.* (2010) در شرایط برون تنی بز و استفاده از بلوط (ترکیبات فنولیک) نیز تخمیر را بهبود بخشیده است. تاکنون گزارش علمی در زمینه کاربرد میوه عناب در تغذیه دام منتشر نشده است. با توجه به اهمیت تغذیه‌ای و زیست‌محیطی دفع گاز متان در نشخوارکنندگان (Hu *et al.*, 2005; Mao *et al.*, 2010) و تأثیر مثبت گیاهان دارویی بر تخمیر شکمبه، هدف از این تحقیق کاربرد و توسعه راهکارهای تغذیه‌ای کاهش متان دفعی و بهبود تخمیر شکمبه‌ای از راه مهار واکنش‌های متان‌زایی با استفاده از گیاه دارویی عناب بود.

## مواد و روش‌ها

### مایع شکمبه

مایع شکمبه از سه رأس گوسفند نژاد سنجایی با میانگین وزن  $36/5 \pm 1/3$  کیلوگرم با استفاده از لوله مری در شرایط ناشتا و بی‌هوازی گردآوری و با استفاده از فلاکس به آزمایشگاه منتقل شد و پس از مخلوط کردن مایع شکمبه هر سه رأس، استفاده شد. گوسفندان با جیره یونجه تغذیه می‌شدند.

### آزمایش تولید گاز

میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بستره (سوبسترا) یونجه استفاده و پودر میوه عناب در سه سطح ۰ (شاهد)، ۳۰ و ۶۰ (میلی‌گرم) و هر سطح در چهار تکرار به محیط تخمیر اضافه شد. بستره یونجه در محیط تخمیر برای سه تیمار به ترتیب ۲۰۰، ۱۷۰ و ۱۴۰ میلی‌گرم بود. بطری‌های شیشه‌ای ویتن<sup>۱</sup> ۱۲۰ میلی‌لیتری و

vulgaris Lam = *Z. sativa* Gaerin = *Ramnus ziziphus* L. (جنگل‌ها، درختان و درختچه‌های ایران=حبیب‌الله ثابتی) و یا *Ziziphus zizyphus* از خانواده Rhamnaceae از گیاهان دارویی است (Said *et al.*, 2011). میوه عناب ساپونین (۳۹/۷ میلی‌گرم اکویی والانت اولانولیک اسید در هر گرم) و فلاوونوئیدها (۶۹۴ میلی‌گرم اکویی والانت روتین در هر ۱۰۰ گرم) (Sun *et al.*, 2011) داشته که این ترکیبات خاصیت ضد میکروبی و ضد پروتوزوایی دارند. در بررسی‌های Wu *et al.* (2014) نیز گزارش شده است که عناب بیست و یک ترکیب مؤثره شامل ۱۰ تری ترپنوئید (Triterpenoid)، دو استرول (Sterol)، شش فلاونوئید (Flavonoid) و سه سربروسید (Cerebrosid) است. فلاوونوئیدها ترکیبات پلی‌فنولیک ۱۵ کربنه با دو حلقه ماده خوش‌بوکننده (آروماتیک) هستند. تان‌های متراکم یا پروآنتوسیانیدین؛ جزء این گروه بوده و پلیمرهایی بزرگ از مولکول‌های فلاوونوئیداند که توسط باندهای کووالان به هم متصل هستند. فلاوونوئیدها نقش‌های متفاوتی مانند تنظیم سوخت‌وساز (متابولیسم) اولیه و خاصیت ضد میکروبی دارند (Bodas *et al.*, 2012).

نتایج بررسی‌های پیشین نشان داده است که استفاده از عصاره‌های گیاهی حاوی ساپونین و فلاوونوئیدها منجر به بهبود تخمیر شکمبه‌ای شده است (Nooriyan Soroor & Rouzbehan, 2012; Abarghuei & Rouzbehan, 2013). استفاده از عصاره گل‌گاوزبان (حاوی ساپونین) در شرایط برون تنی در گوسفند افشاری (Nooriyan Soroor & Rouzbehan, 2012) و روش درون تنی (Nooriyan Soroor *et al.*, 2013) در گوسفندان مهربان منجر به بهبود تخمیر شد. همچنین در بررسی Nemat *et al.* (2012) استفاده از گیاهان دارویی سماق (حاوی ساپونین) (Silva *et al.*, 2013) و میخک (حاوی ساپونین) (Tanko *et al.*, 2008) به روش برون تنی ضمن کاهش متان و پروتوزوا، فرآیند تخمیر را نیز بهبود بخشیده است. گیاه حاوی ساپونین به روش برون تنی (Pilajun & Wanapat, 2011) در گاو میش، ساپونین چای به روش برون تنی در گوسفندان (Hu *et al.*, 2005)، ساپونین

1. Wheaton bottle

میلی‌لیتر و بستره نیز ۱۰۰ میلی‌گرم در نظر گرفته شده بود. درصد گاز متان از میزان گاز کل تولیدی در طی ۲۴ ساعت، بر اساس رابطه ۱ محاسبه شد.

(۱) = درصد گاز متان

$$\frac{(15\text{-گاز پس از تزریق سود (میلی‌لیتر))}{\text{گاز تولیدی پس از ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر)}} \times 100$$

میزان هر یک از اسیدهای چرب فرار استات، پروپیونات و بوتیرات با استفاده از دستگاه رنگ‌نگار گازی (گاز کروماتوگرافی مدل شیماتزو ژاپن) و با ستون مویرگی و با استفاده از استاندارد داخلی (۲- اتیل بوتیریک اسید) تعیین شد. شاخص نسبت استات به پروپیونات نیز محاسبه شد (Patra et al., 2006; Cottyn & Boucque, 1968). غلظت نیترژن آمونیاکی با روش فنول-هیپوکلریت و با استفاده از طیف‌نگار نوری (اسپکتروفتومتر) در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین شد (Broderick & Kang, 1980).

تعیین شاخص PF<sup>۱</sup>، توده میکروبی تولیدی و بازه ساخت (راندمان سنتز) توده میکروبی

شاخص PF (معرف میزان ساخت پروتئین میکروبی) با استفاده از روش Makkar (2010) و یک آزمون تولید گاز جداگانه‌ای تعیین شد. شاخص PF عبارت است از میلی‌گرم ماده آلی تجزیه‌شده واقعی بخش بر میلی‌لیتر گاز تولیدی در ۲۴ ساعت (Vercoe et al., 2010). در این آزمایش میزان ماده آلی تجزیه‌شده نیز تعیین شد. میزان توده میکروبی تولیدی با استفاده از رابطه ۲ و بازده تولید توده میکروبی نیز با استفاده از رابطه ۳ به روش Makkar (2010) محاسبه شد (Vercoe et al., 2010).

$$MM(\text{mg}) = [c - (a - b)] - [NG_{ml} \times 2.2] \quad (2)$$

که در این رابطه MM = میلی‌گرم توده میکروبی تولیدشده؛ c = ماده آلی وزن‌شده در هر بطری (میلی‌گرم)، a = میزان مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (mg)، b = میزان خاکستر مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (mg)، NG = میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی و 2.2 = ضریب استوکیومتری است.

محتویات درون آن (بستره و ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه بفری‌شده) در دمای ۳۹ درجه سلسیوس نگهداری (انکوباسیون) شدند. محلول بافر برابر روش Menke & Steingass (1988) تهیه و با نسبت ۲ به ۱ با مایع شکمبه مخلوط شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری میزان گاز تولیدی کل در هر بطری با استفاده از سرنگ مدرج ۵۰ میلی‌لیتری و گاز متان نیز به روش Fievez et al. (2005) قرائت و آزمایش با چهار تکرار انجام شد.

در یک آزمایش جداگانه به منظور برآورد فعل‌وانفعال (کنیتیک) تخمیر، آزمون تولید گاز با استفاده از بطری‌های شیشه‌ای ویتن (Wheaton Bottle) به مدت ۹۶ ساعت گرمخانه‌گذاری (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴ و ۹۶ ساعت) انجام گرفت. پس از بررسی داده‌های فعل‌وانفعال تخمیر (a, b, c)، چون قرائت گاز در ساعت ۶۶ با ساعات بعدی برابر شد (تخمیر متوقف شد)، لذا پایان تخمیر ساعت ۶۶ تلقی شد. آزمایش در سه نوبت با چهار تکرار در هر نوبت، انجام شد. داده‌های مجموع گاز تولیدی بر اساس معادله نمایی Ørskov & McDonald (1979) تجزیه و تحلیل شد:

$$Y = a + b(1 - e^{-ct})$$

که در این مدل a = گاز تولیدی از بخش سریع تخمیر (میلی‌لیتر)؛ b = گاز تولیدی از بخش کند تخمیر (میلی‌لیتر)؛ c = سرعت تخمیر بخش دیر تخمیر؛ t = زمان نگهداری و y = گاز تولیدی در زمان t است.

#### اندازه‌گیری فراسنجه‌های تخمیر

پس از پایان گرمخانه‌گذاری، میزان گاز تولیدی بطری‌های ویتن با استفاده از سرنگ‌های مدرج اندازه‌گیری شد و بر اساس گاز تولیدی بلانک، تصحیح شد. میزان گاز متان تولیدی در هر بطری با استفاده از روش Fievez et al. (2005) با تزریق ۴ میلی‌لیتر محلول سود ۱۰ مولار برآورد شد. پس از تزریق سود، گاز دی‌اکسیدکربن جذب و باقی‌مانده به اندازه گاز متان خواهد بود. در این روش یک سری بطری شیشه‌ای ویتن مخصوص اندازه‌گیری متان در نظر گرفته شده بود که در این بطری‌ها محلول بافر به میزان ۱۵

بازده ساخت پروتئین میکروبی از نوع درصد است و دارای توزیع دوجمله‌ای هستند (Farsi et al., 2002)، نرمال بودن توزیع آن‌ها در آغاز توسط آزمون نامشخصه‌ای (پارامتری) کولموگروف-اسمیرنوف (K-S) بررسی و آنگاه بر اساس قوانین آمار مشخصه‌ای تجزیه آماری شدند (Hossaini, 2003).

## نتایج و بحث

### فعل و انفعال تخمیر

میوه عناب تأثیر معنی‌داری بر گاز تولیدی از بخش سریع تخمیر و بخش دارای قابلیت (پتانسیل) تخمیر در واحد زمان ( $b$ ) به صورت مجزا در هر دو سطح میوه عناب نداشت، این فرایند با کاهش سرعت تولید گاز ( $c$ ) بخش دارای قابلیت تخمیر در زمان ( $b$ ) نیز قابل مشاهده است (خطی؛  $P < 0.01$ ). اما آنچه مهم است افزایش قابلیت تولید گاز ( $a+b$ ) است که از ۶۴ میلی لیتر گاز افزایش یافته و به ۷۳ میلی لیتر در سطح دوم میوه عناب رسیده است (خطی؛  $P < 0.01$ ). همچنین کاربرد عصاره گل‌گاوزبان (مانند عناب حاوی ساپونین) در بررسی برون تنی Nooriyan Soroor & Rouzbehan (2012) و استفاده از بلوط (مانند عناب حاوی فلاوونوئیدها) در بررسی برون تنی Maldar et al. (2010) بر بز مرخز نتوانست گاز تولیدی بخش دیر تخمیر ( $b$ ) و سرعت تولید این گاز ( $c$ ) را در مقایسه با شاهد تغییر دهد. در اثر کاربرد دو سطح عصاره تفاله انگور (حاوی ترکیبات فنولیک و ساپونین) به روش برون تنی، تغییرات معنی‌دار گاز تولیدی ۹۶ ساعته در بررسی Abarguei et al. (2013) نیز مشاهده شده است و همسان با این تحقیق تأثیری بر شاخص‌های تخمیر ( $a, b$ ) نداشت. همچنین استفاده از پنج سطح عصاره گل‌گاوزبان (ماده مؤثره ساپونین) به روش برون تنی در سطوح ۳، ۳۰، میکرولیتر تأثیری بر فراسنجه  $b$  نداشت ولی در سطوح ۳۰۰ و ۳۰۰۰ میکرولیتر این شاخص را کاهش داده است (Nooriyan Soroor & Rouzbehan, 2012).

### متان و مشخصه‌های تخمیر شکمبه

ترکیبات فنولیک عناب (پی- هیدروکسی بنزوئیک اسید،

$$EMM (\%) = \frac{[c-(a-b)] - [NGml \times 2.2]}{[c-(a-b)]} \times 100 \quad (3)$$

### شمارش جمعیت پروتوزوآ

جمعیت پروتوزوآی مژک‌دار شکمبه برای، سه زیر خانواده *Ophryoscolicinae*، *Entodiniinae* و یک خانواده *Diplodiniinae* و *Isotrichidae* پروتوزوآی کل شمارش شد. پس از پایان فرایند تخمیر، مایع شکمبه با محلول فرمال سالین (formal saline) (محلول حاوی ۸/۱ گرم کلرید سدیم خالص در ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میلی لیتر فرمالین ۳۶ درصد) با نسبت ۱ به ۵، ترکیب شد و تا روز شمارش در دمای یخچال نگهداری شد. شمارش میکروسکوپی پروتوزوآ به روش Kamara et al. (1991) انجام گرفت. در این روش با استفاده از لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰x جمعیت پروتوزوآیی در ۹ نمونه‌گیری برای هر تکرار شمارش شد. شمار پروتوزوآ در هر میلی لیتر مایع شکمبه بر اساس رابطه ۴ محاسبه شد.

$$NPml = \frac{N}{\left[ \text{area mm} \cdot Dmm \cdot \frac{1}{n} \right]} \times 1 \quad (4)$$

که در این رابطه  $NP$  = شمار پروتوزوآ شمارش شده در هر میلی لیتر،  $N$  = شمار پروتوزوآ در هر بار شمارش لام،  $\text{area mm}$  = مساحت هر بخش لام (۱ میلی متر مربع)،  $Dmm$  = عمق هر بخش لام (۰/۱ میلی متر) و  $1/n$  = ضریب رقت ( $1/5$ ) است.

داده‌های به دست آمده از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 18 (2009) برای ۳ تیمار (شاهد، ۳۰ و ۶۰ میلی گرم عناب) در قالب طرح کاملاً تصادفی و بر اساس مدل آماری  $Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$  تجزیه شدند. در این مدل  $Y_{ij}$  میزان هر مشاهده،  $\mu$  میانگین کل،  $T_i$  اثر تیمار و  $\varepsilon_{ij}$  میزان باقیمانده بود. برای مقایسه میانگین هر تیمار با تیمار شاهد از روش آزمون دانت و مقایسه میانگین دوه‌دو تیمارها با یکدیگر از آزمون دانکن در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ استفاده شد. از آنجاکه داده‌های جمعیت پروتوزوآیی از نوع شمارشی است و توزیع پواسن دارند و داده‌های

سایپونین *Yucca schidigera* (۲، ۴ و ۶ میلی لیتر) (Pen, 2007) نیز مشاهده شده است. استفاده از چهار سطح عصاره گل‌گاوزبان (حاوی سایپونین) به روش برون تنی در گوسفندان افشاری گاز متان را بین ۳۱ تا ۵۴ درصد کاهش داد (Nooriyan Soroor & Rouzbehan, 2012) که گزارش کرده‌اند، ناشی از تأثیر سایپونین و ترکیبات فلاوانوئیدی گل‌گاوزبان بوده است.

پروتوزوا مژک‌دار شکمبه‌ای، هیدروژن موردنیاز را به‌عنوان بستره برای ساخت گاز متان برای متانوژن‌ها فراهم می‌کنند (Morgavi et al., 2010). لذا به نظر می‌رسد تأثیر کاهشی پودر میوه عنب در تولید متان، به خاطر وجود ترکیبات فنولیکی فلاوانوئیدی و سایپونین (Sun et al., 2011) و تأثیر مهارکنندگی این ترکیبات بر پروتوزوا مژک‌دار (Hu et al., 2005; Mao et al., 2010) و بر باکتری‌های متان‌زا یا متانوژنیک (Hess et al., 2003) بوده است (جدول ۳). سایپونین احتمال دارد از راه اتصال با استرول غشاء پروتوزوا توانایی تغییر در نفوذپذیری غشاء یاخته و به دنبال آن اختلال در میزان انرژی یاخته را داشته و درنهایت سبب مرگ پروتوزوا شود (Patra et al., 2006).

کامفرول و روتین) و سایپونین آن (Sun et al., 2011) در طی ۲۴ ساعت، تأثیری بر ضریب *b* نداشت (جدول ۱). این مسئله در نبود تغییر تجزیه‌پذیری مواد آلی نیز مشاهده می‌شود. همسان با نتایج این تحقیق، استفاده از سطوح مختلف سایپونین چای (۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌گرم) در شرایط برون‌تنی نیز تأثیری بر تخمیر نداشته و لذا گاز تولیدی ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر) تفاوتی با شاهد نشان نداده است (Hu et al., 2005). ولی استفاده از عصاره گل‌گاوزبان (حاوی سایپونین) در گوسفندان افشاری به روش برون‌تنی توانست گاز ۲۴ ساعت را افزایش دهد که نشان از افزایش تولید گاز دارد (Nooriyan Soroor & Rouzbehan, 2012). گرچه دو گیاه سماق و میخک (حاوی سایپونین) در بررسی برون تنی (Nemati et al., 2012) توانستند گاز کل ۲۴ ساعت را کاهش دهند.

متان تولیدی در حضور عنب در مقایسه با شاهد به ترتیب ۵ و ۶ درصد کاهش (خطی،  $P < 0.05$ ) نشان داد (جدول ۱). کاهش گاز متان در اثر کاربرد سایپونین چای در شرایط برون‌تنی (Hu et al., 2005)، کاربرد عصاره متانولی گیاه *T. chebula* (حاوی سایپونین) (Patra et al., 2006) و کاربرد عصاره گیاه حاوی

جدول ۱. تأثیر سطوح پودر میوه عنب (*Ziziphus zizyphus*) بر مشخصه‌های تخمیر و تولید گاز متان گوسفند در شرایط برون‌تنی  
Table 1. Effect of level of *Ziziphus zizyphus* (ZZ) on fermentation parameters and methane production from *in vitro* using sheep rumen fluid

| Parameters                         | ZZ plant levels<br>(mg/200 mg substrate) |                    |                    | SEM   | P-Value              |       |       |
|------------------------------------|--|--------------------|--------------------|-------|----------------------|-------|-------|
|                                    | Control                                  | 30                 | 60                 |       | Contrasts            |       |       |
|                                    |  |                    |                    |       | Control vs treatment | L     | Q     |
| <b>Fermentation Kinetic Values</b> |  |                    |                    |       |                      |       |       |
| <i>a</i> (ml)                      | 6.3                                      | 8.2                | 8.8                | 0.56  | 0.056                | 0.065 | 0.535 |
| <i>b</i> (ml)                      | 58.1                                     | 58.8               | 61.5               | 0.98  | 0.313                | 0.179 | 0.668 |
| <i>c</i> (/h)                      | 0.091 <sup>a</sup>                       | 0.083 <sup>b</sup> | 0.075 <sup>c</sup> | 0.00  | 0.004                | 0.002 | 0.920 |
| <i>a+b</i>                         | 64.3 <sup>c</sup>                        | 67.0 <sup>cb</sup> | 73.3 <sup>a</sup>  | 0.98  | 0.009                | 0.004 | 0.846 |
| <b>Fermentation Parameters</b>     |  |                    |                    |       |                      |       |       |
| Total Gas (24 h, ml/ 200 mg DM)    | 41.1                                     | 40.3               | 41.5               | 0.98  | 0.915                | 0.980 | 0.652 |
| CH <sub>4</sub> (ml/ 200 mg DM)    | 14.5 <sup>a</sup>                        | 12.1 <sup>b</sup>  | 12.0 <sup>b</sup>  | 0.467 | 0.041                | 0.019 | 0.155 |
| CH <sub>4</sub> (ml/ mg OMD)       | 7.6                                      | 6.2                | 6.3                | 0.251 | 0.078                | 0.059 | 0.079 |
| IVOMDe (%)                         | 52.3                                     | 51.1               | 52.2               | 0.88  | 0.770                | 0.982 | 0.588 |
| IVOMDe (mg/ 200 mg)                | 104.5                                    | 102.2              | 104.4              | 0.77  | 0.771                | 0.982 | 0.588 |
| Ammonia-N (mg/l)                   | 37.4 <sup>a</sup>                        | 29.6 <sup>b</sup>  | 21.0 <sup>c</sup>  | 2.14  | 0.002                | 0.001 | 0.788 |
| PF (mg/ml)                         | 2.54                                     | 2.54               | 2.52               | 0.05  | 0.707                | 0.574 | 0.820 |
| Microbial Mass                     | 14.0                                     | 13.6               | 13.1               | 0.43  | 0.503                | 0.442 | 0.951 |
| Efficiency of Microbial Mass (%)   | 13.6                                     | 13.4               | 12.6               | 0.64  | 0.714                | 0.581 | 0.819 |

$a$  = گاز تولیدی از بخش سریع تخمیر؛  $b$  = گاز تولیدی از بخش دیر تخمیر؛  $c$  = سرعت تولید گاز از بخش دیر تخمیر؛  $a+b$  = قابلیت گاز تولیدی؛ IVOMe ماده آلی تجزیه‌شده؛ PF = گاز تولیدی بخش بر ماده آلی تجزیه‌شده؛ Q = اثر درجه دو؛ L = اثر خطی.

$a$  = the gas production from the soluble fraction;  $b$  = the gas production from the insoluble fraction;  $c$  = the gas production rate constant for the insoluble fraction ( $b$ );  $a+b$  = potential of gas production; IVOMDe = *in vitro* organic matter degradability; PF = partitioning factor; Q = quadratic effect; L = linear effect.

جدول 2. تأثیر سطوح پودر میوه عناب (*Ziziphus zizyphus*) بر اسیدهای چرب فرار تولیدشده در شرایط آزمایش تولید گاز  
Table 2. Effect of level of *Ziziphus zizyphus* (ZZ) on production of volatile fatty acids from *in vitro* gas production

| Parameters             | ZZ plant levels (mg/200 mg substrate) |                   |                   | SEM  | P-Value              |       |       |
|------------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|------|----------------------|-------|-------|
|                        | Control                               | 30                | 60                |      | Contrasts            |       |       |
|                        |                                       |                   |                   |      | Control vs treatment | L     | Q     |
| Total VFA (mmol/L)     | 74.0                                  | 65.36             | 70.39             | 3.53 | 0.345                | 0.622 | 0.296 |
| VFAs (mol/100 mol) (%) |                                       |                   |                   |      |                      |       |       |
| Acetate                | 54.1 <sup>a</sup>                     | 51.4 <sup>a</sup> | 50.7 <sup>b</sup> | 1.88 | 0.041                | 0.047 | 0.457 |
| Propionate             | 20.8 <sup>a</sup>                     | 20.9 <sup>a</sup> | 22.6 <sup>b</sup> | 1.04 | 0.219                | 0.141 | 0.881 |
| Butyrate               |                                       |                   |                   |      |                      |       |       |
| acetate: propionate    | 2.6 <sup>a</sup>                      | 2.4 <sup>a</sup>  | 2.2 <sup>b</sup>  | 0.05 | 0.014                | 0.004 | 0.652 |
| Isobutyrate            | 2.7                                   | 3.1               | 2.3               | 0.3  | 0.992                | 0.567 | 0.337 |
| Isovalerate            | 3.5                                   | 4.24              | 2.9               | 0.43 | 0.834                | 0.434 | 0.097 |
| Valerate               | 2.9 <sup>b</sup>                      | 3.4 <sup>a</sup>  | 3.2 <sup>ab</sup> | 0.24 | 0.043                | 0.014 | 0.082 |

جدول 3. تأثیر سطوح پودر میوه عناب (*Ziziphus zizyphus*) بر جمعیت پروتوزوایی ( $10^5$  / میلی لیتر مایع شکمبه)  
مایع شکمبه گوسفند در شرایط برون تنی  
Table 3. Effect of level of *Ziziphus zizyphus* (ZZ) on protozoa population ( $\times 10^5$ /ml RF) from *in vitro* fermentation using sheep rumen fluid

| Parameters                   | ZZ plant levels (mg/200 mg substrate) |                    |                     | SEM   | P-Value              |       |       |
|------------------------------|---------------------------------------|--------------------|---------------------|-------|----------------------|-------|-------|
|                              | Control                               | 30                 | 60                  |       | Contrasts            |       |       |
|                              |                                       |                    |                     |       | Control vs treatment | L     | Q     |
| Total Protozoa subfamily     | 2.292 <sup>a</sup>                    | 1.708 <sup>b</sup> | 1.371 <sup>b</sup>  | 0.184 | 0.004                | 0.003 | 0.196 |
| <i>Entodiniinae</i>          | 1.333 <sup>a</sup>                    | 0.667 <sup>b</sup> | 0.708 <sup>b</sup>  | 0.116 | 0.007                | 0.016 | 0.069 |
| <i>Ophryoscoleceinae</i>     | 0.000 <sup>c</sup>                    | 0.375 <sup>a</sup> | 0.125 <sup>ab</sup> | 0.071 | 0.077                | 0.409 | 0.034 |
| <i>Diplodininae</i>          | 0.543                                 | 0.416              | 0.413               | 0.072 | 0.811                | 0.836 | 0.905 |
| <i>Isotrichidae</i> (Family) | 0.416                                 | 0.250              | 0.125               | 0.081 | 0.209                | 0.170 | 0.905 |

ترکیبات فنولیک و ساپونین عناب (Sun *et al.*, 2011) به احتمال باعث کاهش فعالیت آنزیم اوره آز و در نهایت سبب کاهش نیتروژن آمونیاکی شده باشد (Hussain & Cheeke, 1995). به نظر می رسد نبود هم زمان سازی آنزیمی و منابع نیتروژن (Bach *et al.*, 2005) سبب شده که کاهش نیتروژن آمونیاکی با افزایش پروتئین میکروبی همراه نشود. نتایج همسانی نیز مبنی بر کم شدن نیتروژن آمونیاکی در حضور گیاه حاوی ساپونین *Yucca schidigera* (Pen *et al.*, 2006)، عصاره گیاه حاوی ساپونین *Quillaja saponaria* (Pen, 2007) و میخک (حاوی ساپونین) در بررسی برون تنی (Nemati *et al.*, 2012) گزارش شده است.

مقایسه نتایج و بررسی رابطه گاز متان (به ازای ماده آلی تجزیه شده) با شاخص PF مشخص می کند که نبود کاهش گاز متان با نبود تغییر در شاخص PF همراه است. گرچه برخلاف این نتایج، نتایج تحقیقات؛ Goel *et al.* (2008)، Blümmel *et al.* (2005)، Nooriyan Soroor & Rouzbehan (2012) با استفاده از عصاره گل گاوزبان و Abarghuei & Rouzbehan (2013) با استفاده از عصاره تفاله انگور

مواد مؤثره میوه عناب تأثیری بر تجزیه پذیری ماده آلی (کربوهیدرات، پروتئین و لیپیدها) نداشته است. لذا گرچه نتوانسته تجزیه پذیری را بهبود ببخشد ولی نداشتن کاهش تجزیه پذیری نیز سودمند تلقی می شود. چون در بعضی از موارد ترکیبات مؤثر افزودنی ضمن کاهش گازهای گلخانه ای تأثیر کاهشی بر قابلیت هضم نیز دارند (Patra *et al.*, 2006). در بررسی اثر عصاره گل گاوزبان به روش برون تنی نیز تجزیه پذیری ماده آلی تغییری نداشته است (Nooriyan Soroor & Rouzbehan, 2012). برخلاف نتایج این تحقیق، Patra *et al.* (2006) تأثیر مهارکنندگی عصاره های گیاهی *A. indica* و *E. officinalis*، *T. chebula* (حاوی ساپونین) بر قابلیت گوارش ماده آلی را ناشی از تأثیر ترکیبات مؤثره این گیاهان بر فعالیت باکتریایی و آنزیمی دانسته اند.

کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم/ دسی لیتر) در تیمارهای حاوی عناب در مقایسه با تیمار شاهد همراه با نبود تغییر در میزان تولید توده میکروبی و بازده تولید توده پروتئین میکروبی بوده که این امر در PF نیز مشاهده می شود. به نظر می رسد

(2013) ساپونین و ترکیبات فنولیک عصاره تفاله انگور تأثیری بر اسیدهای چرب فرار کل گوسفند نداشته است. گرچه در بررسی *Patra et al.* (2006) در اثر کاربرد عصاره دو گیاه *T. chebula* و *A. indica*، بررسی *Alexander et al.* (2008) در اثر کاربرد عصاره *Moringa oleifera* (حاوی ساپونین و ترکیبات فلاونوئید) اسیدهای چرب فرار کل کاهش داشته‌اند. همچنین افزایش (خطی؛  $P < 0.05$ ) درصد اسید چرب شاخه‌دار والرات نیز مشاهده می‌شود. تولید بیشتر اسیدهای چرب شاخه‌دار نشان‌دهنده قابلیت پایین برای کاربرد پروتئین و آمونیاک در مایع شکمبه بوده که سرانجام به اوره تبدیل شده و از بدن دام دفع می‌شود (Allison, 1978). لذا از آنجایی که آمونیاک در حضور افزودنی عناب کاهش یافته، انتظار می‌رفت که میزان پروتئین میکروبی افزایش یابد، اما نبود دستیابی به این مسئله (نبود افزایش پروتئین میکروبی) و افزایش والرات، احتمال دارد دلیلی بر دفع منابع نیتروژنه به شکل اوره است.

#### جمعیت پروتوزوآ

جمعیت پروتوزوآیی کل در هر دو سطح میوه عناب کاهش داشته است (خطی؛  $P < 0.01$ ). که احتمال دارد به دلیل وجود ترکیبات فنولیک (پی-هیدروکسی بنزوئیک اسید، کامفرول و روتین) (Said et al., 2011)، فلاونوئیدی و ساپونین (Sun et al., 2011) در این گیاه است. تغییرات به‌گونه‌ای است که جمعیت پروتوزوآیی کل در سطح دوم گیاه افزودنی در مقایسه با شاهد نزدیک به نصف شده است. ترکیبات فنولیک با ایجاد پیوند با استرول غشاء یاخته‌ای پروتوزوآ، سبب تغییر نفوذپذیری یاخته شده و در نهایت منجر به تجزیه یاخته‌ای پروتوزوآ می‌شود (Patra et al., 2006; Newbold et al., 1995). نتایج همسانی نیز در زمینه ترکیبات حاوی ساپونین توسط Hess et al. (2003) برای گیاه *S. saponaria*، Pen. (2007) برای گیاهان *Yucca schidigera* و *Quillaja saponaria* و *Sesbania* و Fenugreek (2008) *al.* در زمینه تأثیر ترکیبات فنولیک و ساپونین نیز گزارش شده است.

نشان از افزایش این شاخص دارد. لذا بنابر نظر *Blümmel et al.* (1997) نبود تغییر شاخص PF در این بررسی نشان‌دهنده نبود تأثیر مثبت میوه عناب بر فرآیند سوخت‌وساز پروتئین میکروبی است. هرچند شاخص PF در این بررسی در دامنه عددی قابل قبول بود (Blümmel et al., 1997).

ترکیبات مؤثره عناب؛ بدون این که تأثیری بر اسیدهای چرب فرار کل (میلی‌مول / لیتر) داشته باشند، در سطح ۶۰ میلی‌گرم عناب سبب کاهش درصد اسید استیک (خطی،  $P < 0.05$ ) و افزایش پروپیونیک (خطی،  $P < 0.05$ ) شده است (جدول ۲). شرایط محیط تخمیر به سمت کاهش واکنش‌های استوژنیک یا همان کاهش تولید  $H_2$  و افزایش واکنش‌های تولید پروپیونیک یا همان کاربرد  $H_2$  پیش رفته است. برابر با معادله‌های استوکیومتری، کاهش واکنش‌های استوژنیک به معنی کاهش میزان هیدروژن در محیط است (Alemua et al., 2011) که این موضوع ممکن است دلیلی برای کاهش تأمین هیدروژن برای آرکابا باکتری‌ها برای تولید متان باشند. لذا مشاهده می‌شود که متان نیز به میزان کمی (۲/۵ میلی‌لیتر) کاهش داشته است. همچنین در سطح دوم افزودنی، افزایش پروپیونات نیز معنی‌دار است که این تغییرات همراه با کاهش متان به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر نسبت به شاهد است. کاهش متان همراه با کاهش اسید استیک با استفاده از میخک و سماق (حاوی ساپونین) در بررسی *Nemati et al.* (2012) مشاهده شده است.

کاهش درصد اسید استیک و افزایش اسید پروپیونیک نسبت به تیمار شاهد به صورتی است که در نهایت کاهش نسبت اسید استیک به پروپیونیک (استات: پروپیونات) را به دنبال داشته است. این تغییرات احتمال دارد ناشی از تأثیر مهارکنندگی ترکیبات فلاونوئید و ساپونین عناب بر جمعیت پروتوزوآ بوده که همسو با بررسی‌های پیشین (Abarghuei & Rouzbehan, 2013; Patra et al., 2000; Wang et al., 2006) است. کاهش شمار پروتوزوآ (جدول ۳) گاهی با افزایش درصد پروپیونات و کاهش نسبت استات به پروپیونات همراه است (Hess et al., 2003; Patra et al., 2006).

در بررسی آزمایشگاهی Abarghuei & Rouzbehan

آزمایشگاهی توانسته است جمعیت کل، ایزوتریچا، انتودینینه، دیپلودینینه و افریواسکالسینه را کاهش دهد (Abarghuei & Rouzbehan, 2013).

#### نتیجه‌گیری کلی

در شرایط برون‌تنی، عنب بدون تأثیر منفی بر قابلیت هضم، قابلیت تخمیر ( $a+b$ ) را بهبود، گاز متان و نیتروژن آمونیاکی را به ترتیب به میزان ۶ و ۴۳ درصد کاهش داد. کاهش جمعیت پروتوزوایی، افزایش در درصد پروپیونات و کاهش نسبت استات به پروپیونات همراه به کاهش میزان متان به احتمال می‌تواند در بازده انرژی در حیوان مؤثر باشد. به‌هرحال باید برای حصول اطمینان، میوه این گیاه روی دام زنده نیز بررسی شود و در صورت تأیید، پس از شناسایی دقیق همه ترکیبات مؤثره و ساخت همسان آزمایشگاهی آن‌ها، نوع فعل‌وانفعال آن‌ها روی دام زنده نیز آزمایش شود.

نتایج نشان داد که عنب تأثیری بر جمعیت دیپلودینوم و ایزوتریشیدا نداشت ولی انتودینوم (خطی؛  $P < 0.05$ )، افریواسکالکس (غیرخطی؛  $P < 0.05$ ) را کاهش داد. در بررسی گیاه *Yucca schidigera* (حاوی ساپونین) Wang *et al.* (2000) بیان داشته‌اند که ساپونین استرادیل تأثیر مهارکنندگی بر پروتوزوآ مژک‌دار داشته و از این راه سبب کاهش گاز متان می‌شوند. در این بررسی نیز کاهش جمعیت پروتوزوآ، کاهش متان و افزایش اسید پروپیونیک مؤید تأثیر ضدپروتوزوایی ترکیبات مؤثره عنب (ترکیبات فنولیک و ساپونین) است. گزارش‌های چندی در زمینه تأثیر کاهشی ترکیبات فنولیک و ساپونین گیاهان متنوع بر جمعیت پروتوزوایی و به دنبال آن کاهش متان وجود دارد (Mao *et al.*, 2010; Goel *et al.*, 2008; Pen, 2007). همچنین استفاده از دو سطح (۱۵ و ۳۰ میکرولیتر) عصاره تفاله انگور (حاوی ساپونین و ترکیبات فنولیک) در شرایط

#### REFERENCES

- Abarghuei, M.J. & Rouzbehan, Y. (2013). Influence of grape pomace extract on *in vitro* gas production kinetics and on ruminal unicellular population of inoculum in sheep. *Iranian Journal of Animal Science* (Tehran, Islamic Repub. Iran), 44(4), 375-384.
- Alemua, A.W., Dijkstra, J., Bannink, A., Franced, A. & Kebreab, E. (2011). Rumen stoichiometric models and their contribution and challenges in predicting enteric methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167, 761-778.
- Alexander, G., Singh, B., Sahoo, A. & Bhat, T. (2008). *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 229-244.
- Allison, M.J. (1978). Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. *Applied Environment Microbiology*, 35, 872-877.
- Bach, A., Calsamiglia, S. & Stern, M. D. (2005). Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal Dairy Science*. 88,(E. Suppl.): E9-E21.
- Blümmel, M., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (1997). *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal Animal Physiology Nutrition*, 77, 24-34.
- Blümmel, M., Givens, D.I. & Moss, A.R. (2005). Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an *in vitro* gas procedure. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 379-390.
- Bodasa, R., Prietoa, N., García-González, R., Andrésa, S., Giráldeza, F.J. & Lópezza, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 78-93.
- Broderick, G.A. & Kang, J.H. (1980). Automated simultaneous determinations of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal Dairy Science*, 63, 64-75.
- Broudicou, L.P., Papon, Y. & Broudicou, A.F. (2000). Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, 87, 263-277.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P.W. & Kamel, C. (2005). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal Dairy Science*, 88, 2508-2516.
- Cottyn, B.G. & Boucque, C.V. (1968). Rapid method for the gas-chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 16, 105-107.



13. Farsi, M., Marjani, A. & Bakhtiyari, S. (2002). Experimental designs in agricultural sciences. Beh Nashr prss.414p.(in Farsi)
14. Fievez, V., Babaymo, O.J. & Demeyer, D. (2005). Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 197-210.
15. Goel, G., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (2008). Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 72-89.
16. Guo, Y.Q., Liu, J.X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E. & McSweeney, C.S. (2008). Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letter Applied Microbiology*, 47, 421-426.
17. Hess, H.D., Kreuzer, M., Diaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Soliva, C.R. & Machmuller, A. (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunted and defaunted rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109, 79-94.
18. Hossaini, Y. (2003). Nonparametric Statistic. Allame Tabataba-ee University prss.271p. (in Farsi).
19. Hu, W.L., Liu, J.X., Yr, J.A., Wu, Y.M. & Guo, Y.Q. (2005). Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 120, 333-339.
20. Hussain, I. & Cheeke, P.R. (1995). Effect of *Yucca Scidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 51, 231-242.
21. Johnson, K.A. & Johnson, D.E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal Animal Science*, 73, 2483-2492.
22. Kamra, D.N., Sawal, R.K., Pathak, N.N., Kewalramani, N. & Agarwal, N. (1991). Diurnal variation in ciliate protozoa in the rumen of blackbuck (*Antilope cervicapra*). *Letter of Applied Microbiol*, 13, 165-167.
23. Makkar, H.P.S. (2010). *In Vitro Screening of Feed Resources for Efficiency of Microbial Protein Synthesis* (pp. 106-144). In: *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies* (Ed.), New York: Springer.
24. Maldar, S.M., Rouzbehan, Y. & Alipour, D. (2010). The effect of adaptation to oak leaves on digestibility (*in vitro*) and ruminal parameters in Alamout goat. *Iranian Journal of Animal Science* (Tehran, Islamic Repub. Iran), 41(3), 243-252. (in Farsi)
25. Mao, H.L., Wang, J.K., Zhou, Y.Y. & Liu, J.X. (2010). Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science*, 129, 56-62.
26. Menke, K.H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28, 7-55.
27. Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C. & Newbold, C.J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4, 1024-1036.
28. National Research Council. (2007). Nutrient Requirements of Small Ruminants. National academy Press, Washington, DC., USA.
29. Nemati, F., Rouzbehan, Y., Karimi tarshizi, M.A. & Rezaei, J. (2012). An Investigation of the effect of some medicinal plants on *in vitro* ruminal fermentation parameters. *Iranian Journal Animal Science*, (Tehran, Islamic Repub. Iran). 43, 193-206. (in Farsi)
30. Nooriyan Soroor, M.E. & Rouzbehan, Y. (2012). The influence of *Echium amoneum* extract on *in vitro* ruminal fermentation, protozoa population and reduction of methane production. *Iranian Journal Animal Science*, (Tehran, Islamic Repub. Iran). 43,287-296. (in Farsi)
31. Nooriyan Soroor, E., Rouzbehan, Y. & Alipour, D. (2013). Effect of *Echium amoenum* extract on the growth rate and fermentation parameters of mehraban lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 184, 49-57.
32. Ørskov, E.R. & McDonal, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal Agriculture Science*, 92, 499-503.
33. Patra, A.K., Kamra, D.N. & Agarwal, N. (2006). Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 276-291.
34. Pen, B., Sar, C., Mwenya, B., Kuwaki, K., Morikawa, R. & Takahashi, J. (2006). Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. *Animal Feed Science and Technology*, 129, 175-186.
35. Pen, B. (2007). *Studies on manipulation of ruminal fermentation and methanogenesis by natural products*. Ph.D. dissertation, Major Chair of Animal Production the United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University.

36. Pilajun, R. & Wanapat, M. (2011). Effect of coconut oil and mangosteen peel supplementation on ruminal fermentation, microbial population, and microbial protein synthesis in swamp buffaloes. *Livestock Science*, 141, 148-154.
37. Said, A., Huefner, A., Abu Tabl, El-S.A. & Fawzy, G. (2011). Phenolic compounds from seeds of *Zizyphus spina-christi*. *IUFS Journal Biology*, 70(1), 39-43.
38. Silva, M.D., Mota, F.B.C., Rodrigues, M.D., Alves, O.D. & Maia, V.H. (2013). Crude extracts and semi-fractions from *Myracrodruon urundeuva* with antibacterial activity against American type culture collection (ATCC) strains of clinical relevance Carvalho. *Journal Medicine Plants Research*, 7(32), 2407-2413.
39. SPSS. (2009). SPSS Version 18.0 for Windows. SPSS Inc., USA.
40. Sun, Y.-F., Liang, Z.-S., Shan, C.-J., Viernstein, H. & Unger, F. (2011). Comprehensive evaluation of natural antioxidants and antioxidant potentials in *Zizyphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou fruits based on geographical origin by TOPSIS method. *Food Chemistry*, 124, 1612-1619.
41. Tanko, Y., Mohammed, A., Okasha, M. A., Umar, A. H. & Magaji, R. A. (2008). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of ethanol extract of *Syzygium aromaticum* flower bud in wistar rats and mice. *African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(9), 209-212.
42. Vercoe, E.P., Makkar, H.P.S. & Schlink, A.C. (2010). *In Vitro* Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies (Ed.), *In Vitro Screening of Feed Resources for Efficiency of Microbial Protein Synthesis*, (pp. 106-144). New York: Springer.
43. Wanapat, M., Mapato, C., Pilajun, R. & Toburan, W. (2011). Effects of vegetable oil supplementation on feed intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristic of growing swamp buffaloes. *Livestock Science*, 135, 32-37.
44. Wang, Y., McAllister, T.A., Yanke, L.J. & Cheeke, P.R. (2000). Effect of steroidal saponins from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal Applied Microbiology*, 88, 887-896.
45. Wu, Y., Chen, M., Du, M. -B., Yue, C. -H., Li, Y. -Y., Zhu, M., Liu, C., Wang, D.-Y., Liu, J.-G. & Hu, Y.-L. (2014). Chemical constituents from the fruit of *Zizyphus jujuba* Mill. var. *spinosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 57, 6-10.

## The influence of *Ziziphus zizyphus* fruit on in vitro fermentation parameters, protozoa pupolation and methane gas production

Mohammad Ebrahim Nooriyan Soroor<sup>1\*</sup> and Mohammad Mahdi Moeini<sup>2</sup>

1, 2. Assistant Professor and Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

(Received: Sep. 10, 2014 - Accepted: Jan. 14, 2016)

### ABSTRACT

In this experiment, the effect of different levels of *Ziziphus zizyphus* (ZZ) (0, 30 or 60 mg) on fermentation parameters, total protozoa population and three sub family of protozoa *Entodiniinae*, *Ophrysolecinae*, *Diplodiniinae* and family of *Isotrichidae* and methane gas production was assessed using *in vitro* method and a completely randomized design. The rate of gas production for the insoluble fraction (c) ( $P<0.01$ ) was decreased but ( $P<0.01$ ) fermentation potential (a+b) at 30 and 60 mg ZZ by was improved 3 and 6 percent respectively. Cumulative gas production at 24h was not significantly different among treatments; however methane production was decreased ( $P<0.05$ ). Ammonia nitrogen also was linearly decreased ( $P<0.01$ ) by 20.85 and 43.85 percent, respectively. Incorporation of 60 mg ZZ to the basal diet decreased acetate ( $P<0.05$ ) and increased propionate ( $P<0.05$ ) and ratio of acetate to propionate was decreased ( $P<0.01$ ) from 2.6 to 2.2. Total protozoa population ( $P<0.01$ ) and *Entodinium* count was decreased ( $P<0.05$ ). However *Ophrysolex*s number increased ( $P<0.05$ ). Based on this study, it is suggested that supplementation of ZZ could improve *in vitro* ruminal fluid fermentation in terms of potential extent of gas production (6%), reduction of methane losses (17.4%),  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration (43.8%), acetate to propionate ratio (0.2 ratio) and protozoal population.

**Keywords:** Gas production, methane, protozoa, rumen fermentation, sheep, *Ziziphus zizyphus*.