نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد سوم، شماره سوم، ۱۳۹۴
http://ejrr.gau.ac.ir

جمعیت پروتوزوآیی و تولید پروتئین میکروبی در گوسفندان تغذیه شده با دانه گلرنگ مایکروویو شده

*حمید پایا[۱]، اکبر تقی‌زاده[۲]، حسین جانمحمدی[۳]، غلامعلی مقدم[۲] و علی حسینخانی[۳]

[۱]استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، [۲]استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، [۳]دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۷

چکیده

سابقه و هدف: بر اساس مطالعات انجام گرفته و ویژگی‌های منحصربفرد دانه گلرنگ از جمله میزان بالای اسید لینولئیک دانه و همچنین بومی بودن آن در ایران و ضرورت فرآوری دانه‌های روغنی و در نظر گرفتن مزیت‌های فرآوری با امواج مایکروویو و تأثیر احتمالی آن بر اکوسیستم شکمبه‌ای، تحقیق حاضر جهت بررسی تأثیر تغذیه دانه روغنی گلرنگ خام و فرآوری شده با مایکرویو بر اکوسیستم شکمبه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: بدین‌منظور جهت بررسی تأثیر تغذیه دانه روغنی گلرنگ خام و دانه گلرنگ فرآوری شده با مایکروویو بر اکوسیستم شکمبه از قبیل pH، اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی، جمعیت پروتوزوآیی و تولید پروتئین میکروبی از ۳ رأس گوسفند نر فیستولاگذاری شده استفاده شد. این طرح در قالب طرح چرخشی ساده و در ۳ دوره ۲۴ روزه اجرا شد که ۲۱ روز برای عادت پذیری و ۳ روز برای جمع‌آوری نمونه‌ها اختصاص داده شد. جهت بررسی میزان اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی، جمعیت پروتوزوآیی و تولید پروتئین میکروبی به ترتیب از روش‌های تقطیر با روش مارخام، اسپکتوفتومتر، لام نئوبار و اندازه گیری مشتقات بازهای پورینی استفاده شد. در این آزمایش ۴ درصد دانه گلرنگ خام و مایکروویو شده جایگزین سبوس در جیره شاهد شد.

*مسئول مکاتبه: hamid.paya@tabrizu.ac.ir

یافته‌ها: نتایج طرح نشان داد که تیمارهای مختلف اثری بر pH، میزان اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی شکمبه نداشتند. تأثیر افزودن دانه روغنی گلرنگ خام و فرآوری شده با مایکروویو بر جمعیت کل پروتوزوآیی و دو جنس انتودینیوم و دیپلودینیوم شکمبه مورد تحقیق قرار گرفت و افزودن دانه روغنی گلرنگ خام و فرآوری شده با مایکروویو موجب کاهش معنی دار جمعیت کل پروتوزوآیی شکمبه شد (P<۰/۰۵) ولی تفاوت معنی داری بین تیمارهای گلرنگ خام و فرآوری شده مشاهده نشد. تغذیه دانه گلرنگ مایکروویو شده موجب کاهش معنی دار جمعیت جنس انتودینیوم (P<۰/۰۵) و کاهش غیر معنی دار جنس دیپلودینیوم شد. تغذیه دانه گلرنگ مایکروویو شده میزان مشتقات پورین دفعی، جذبی و نیتروژن میکروبی وارد شده به دوازدهه را کاهش داد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: با در نظر گرفتن نتایج حاصل می‌توان عنوان نمود که مصرف دانه گلرنگ خام و فرآررى شده با مایکروویو به میزان ۴ درصد ماده خشک جیره، تأثیر منفی بر اکوسیستم شکمبه از قبیل pH و اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی نداشته و با در نظر گرفتن کاهش سنتز پروتئین میکروبی در تنظیم جیره غذایی، می‌توان از دانه گلرنگ به‌عنوان یک دانه روغنی با ارزش در جیره غذایی گوسفندان و نشخوارکنندگان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: دانه گلرنگ، مایکروویو، اکوسیستم شکمبه، پروتوزوآ، پروتئین میکروبی

مقدمه

یکی از اصلی‌ترین ویژگی‌های گیاه گلرنگ، بومی بودن این گیاه و قدرت سازگاری بالای آن با شرایط محیطی خشک و نیمه‌خشک (شرایط آب و هوایی کشور ایران) و امکان کشت آن در بسیاری از مناطق کشور ایران می‌باشد. روغن دانه گلرنگ به واسطه دارا بودن میزان بالایی از اسید چرب لینولئیک، کیفیت قابل ملاحظه‌ای دارد ولی تحقیقات کمی در زمینه کاربردی نمودن مصرف این دانهٔ روغنی در جیره غذایی نشخوارکنندگان انجام شده است. گلرنگ و کنجاله گلرنگ تا حدی ملین و تلخ مزه می‌باشد که این موارد به‌دلیل وجود دو ترکیب ضدمغذی ۲- هیدورکسی آرکتین[1] به عنوان مسهل و متایرسینول مونو گلایکوسید[2] به‌عنوان عامل تلخی موجود در دانه می‌باشد ، که به واسطه انجام اصلاح ژنتیکی به مرور زمان نیز از میزان این دو ماده ضدتغذیه ای در دانه‌های گلرنگ کاسته شده است (۲۵). وجود مقادیر زیاد اسید لینولئیک در این دانهٔ روغنی باعث تغییر در اکوسیستم شکمبه همانند میزان پروتوزوآیی و تولید پروتئین میکروبی می‌شود.

دی‌اس‌شاک و همکاران (۲۰۱۱)، اثر جایگزینی دو نوع دانه گلرنگ تجاری و دانه گلرنگ اصلاح نژاد شده (دانه‌های حاوی چربی بیشتر و فیبر پایین تر) با پنبه دانه در جیره گاوهای شیری را بررسی و نشان دادند که افزودن ۳ درصد دانه گلرنگ کامل (از کل جیره) به جای پنبه دانه، اثری بر میزان مصرف خوراک، تولید شیر و چربی تولید ندارد و همچنین با افزودن دانه گلرنگ از غلظت فیبر جیره کاسته می‌شود. این محققین گزارش کردند که افزودن دانه گلرنگ تأثیری بر pH و نیتروژن آمونیاکی شکمبه نداشته و غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه را نیز تحت تأثیر قرار نمی‌دهد (۱۰).

باه و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند افزودن ۲۷ گرم در کیلوگرم روغن گلرنگ به جیره تلیسه‌های جرزی، کاهش شدیدی در جمعیت پروتوزوآیی شکمبه به وجود آمده و دلیل آن را وجود مقادیر بالای اسید لینولئیک در روغن گلرنگ عنوان کردند. همچنین این محققین پیشنهاد نمودندکه از بین منابع ضد پروتوزوآیی تانن، ساپونین و اسید لینولئیک، قوی ترین اثر را اسید لینولئیک دارد که منبع عمده آن نیز روغن دانه گلرنگ می باشد (۳).

دانه گلرنگ به واسطه دارا بودن اسید لینولئیک بالا می تواند اکوسیستم شکمبه را تحت تأثیر قرار دهد. ایوان و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر افزودن ۶ درصد روغن آفتابگردان به جیره بر اکوسیستم شکمبه

1. 2-hydroxyarctiin
2. Matairsinol monoglucoside

گوسفندان را بررسی و نشان دادند افزودن روغن آفتابگردان سبب کاهش جمعیت پروتوزوآیی، افزایش pH، کاهش نیتروژن آمونیاکی و کاهش کل اسیدهای چرب فرار (P<۰/۰۵) شکمبه شده است (۲۱).

کارامونا (۲۰۰۴) با استفاده از سطوح ۴ و ۸ درصد گلرنگ فرآوری نشده و کامل (در ماده خشک جیره) در جیره غذایی دام، نشان داد که حدود ۵۵ درصد دانه مصرفی در مدفوع یافت می‌شود که این موضوع بیانگر اهمیت فرآوری این دانه روغنی است (۶).

یکی از فرآوری‌هایی که امروزه بیشتر به آن توجه می‌شود فرآوری با مایکروویو می‌باشد. از مزایای استفاده از این فناوری در عمل‌آوری خوراک‌ها می‌توان به برخورداری از سرعت حرارت دهی بسیار بالا برای مواد خوراکی، سهولت استفاده از آن و عدم وجود آلودگی محیط زیست، توانایی قابل توجه در جلوگیری از کپک زدگی خوراکها در شرایط انبار و ذخیره مواد خوراکی، ارجحیت این روش حرارت دهی در مقایسه با سایر روش‌های معمول حرارت دهی، مثل حرارت دهی با آب داغ، به دلیل آسیب حرارتی کمتر به ماده آزمایشی وارد کرده و جلوگیری از ایجاد واکنشهای بیوشیمیایی در خوراک (۳۵)، افزایش قابلیت دسترسی پروتئین و مواد معدنی به‌دلیل کاهش عوامل ضد تغذیه ای مثل بازدارنده‌های تریپسین، فیتات و تانن (۱۳) و صرفه جویی در وقت و بازده انرژی (۲۷) اشاره نمود.

آزاد مرد و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند عمل‌آوری دانه روغنی کلزا با امواج مایکرویو سبب افزایش معنی دار میزان استخراج چربی از دانه‌ها می‌گردد. این محققین افزایش استخراج چربی در اثر عمل آوری با مایکرویو را در ارتباط با تخریب بافت سلولی دانه‌های روغنی و آزاد شدن بیشتر چربی از این سلول‌ها را عنوان کردند (۲).

در نهایت، با در نظر گرفتن ویژگی‌های منحصربه فرد گیاه گلرنگ (بومی بودن و سازگاری بالای آن با آب و هوای ایران) و دانه گلرنگ (میزان بالای اسید لینولئیک) و ضرورت فرآوری دانه‌های روغنی و در نظر گرفتن مزیت‌های فرآوری با امواج مایکروویو (از جمله آزاد شدن بیشتر اسیدهای چرب دانه‌های روغنی) و تأثیر احتمالی آن بر اکوسیستم شکمبه‌ای، تحقیق حاضر جهت بررسی تأثیر تغذیه دانه روغنی گلرنگ خام و فرآوری شده با مایکرویو بر اکوسیستم شکمبه، تولید پروتئین میکروبی و جمعیت پروتوزوآیی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش از ۳ رأس گوسفند نر نژاد قزل فیستولاگذاری شده با میانگین وزنی ۳۹/۹

کیلوگرم استفاده شد. در ابتدا گوسفندان از نظر سلامتی، وضعیت دندان‌ها و عاری بودن از انگل‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند و دام‌های مورد آزمایش بصورت انفرادی و در قفس‌های متابولیکی نگهداری شدند. جیره‌های مورد استفاده در این آزمایش بر اساس جداول انجمن ملی تحقیقات (۱۹۸۵) تنظیم شد (۲۹). ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ ذکر شده است. جیره‌ها تا حد اشتها و به صورت کاملاً مخلوط و در دو وعده در اختیار گوسفندان قرار گرفت.

بررسی اکوسیستم شکمبه: جهت بررسی pH، اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی شکمبه، مایع شکمبه ۳ ساعت پس از خوراکدهی از طریق فیستولا جمع‌آوری و بلافاصله با طوری ۴ لایه صاف گردید. جهت تعیین pH، بلافاصله پس از گرفتن نمونه، با استفاده از pH متر سیار که در محل کالیبره شده بود استفاده شد. پس از تعیین pH، به منظور توقف اعمال هضمی و تخمیرات به ازای هر میلی لیتر از مایع شکمبه ۲۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱ درصد به آن افزوده شد و به منظور آنالیز اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد (۱۸).

جهت اندازه‌گیری کل اسیدهای چرب فرار از روش مارخام (۱۹۴۲) و با دستگاه تقطیر مارخام در دو مرحله تقطیر و تیتراسیون استفاده شد. جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی شکمبه نیز از روش برودریک و کنگ (۱۹۸۰) و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۳۰ نانو متر استفاده شد (۲۶، ۵).

شمارش پروتوزوآ: پس از تهیه نمونه مایع شکمبه و صاف کردن آن، با محلول فرمالین (۱۰۰ میلی لیتر فرمالدئید ۴۰ درصد و ۸/۵ گرم نمک مرک را با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده) به نسبت ۱ به ۴ (۱ قسمت مایع شکمبه، ۴ قسمت فرمالین) فیکس و نگهداری شدند (۲۲). جهت شمارش پروتوزوآ از روش ایوان و همکاران (۲۰۰۰) و جهت شناسایی پروتوزوآها از کتاب اوگیموتو و ایمای (۱۹۸۱) استفاده شد (۲۲ و ۳۱). عمل شمارش پروتوزوآها توسط استریومیکروسکوپ و عدسی با بزرگنمایی ۴۰X بوسیله لام نئوبار صورت گرفت. برای هر نمونه ۴ بار شمارش انجام گرفت و در صورتی که بین تعداد پروتوزوآهای شمارش شده اختلاف بالایی وجود داشت، شمارش تکرار می‌شد. در شناسایی گونه پروتوزوآها نیز بطور کلی معیارهای زیرین برای طبقه بندی مورد استفاده قرار گرفت:

جدول ۱- مواد خوراکی مورد استفاده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های آزمایشی (درصدی از ماده خشک جیره)

Table 1. Ingredient and chemical composition of the diets (percent of diet dry matter).

ترکیب مواد خوراکی	جیره‌های مورد آزمایش Treatment diets		
	شاهد control	دانه گلرنگ خام Raw safflower seed	دانه گلرنگ فرآوری شده با مایکروویو Microwave irradiated safflower seed
یونجه خشک (Alfalfa hay)	40	40	40
دانه جو (Barley grain)	40	40	40
کنجاله تخم پنبه (Cottonseed meal)	10	10	10
سبوس گندم (Wheat bran)	9	5	5
دانه گلرنگ خام (Whole safflower seed)	–	4	–
دانه گلرنگ فرآوری شده با مایکروویو (Microwave irradiated safflower seed)	–	–	4
مکمل ویتامین و مواد معدنی[1] (Minerals and vitamins supplement)[1]	0.5	0.5	0.5
نمک (Salt)	0.5	0.5	0.5
مواد مغذی (Nutrient)			
انرژی قابل هضم (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) Digestible energy ruminant (Mcal/kg DM)	3.12	3.14	3.14
انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) Metabolisable energy (Mcal/kg DM)	2.5	2.7	2.7
پروتئین خام (درصد) Crude Protein (%)	15.87	16.03	16.03
کلسیم (درصد) Calcium (%)	0.58	0.59	0.59
فسفر (درصد) Phosphorus (%)	0.25	0.23	0.23

۱- محتوی ۱۹۶ گرم کلسیم، ۹۶ گرم فسفر، ۷۱ گرم سدیم، ۱۹ گرم منیزیوم، ۳ گرم آهن، ۰/۳ گرم مس، ۲ گرم منگنز، ۳ گرم روی، ۱۰۰ ppm کبالت، ۱۰۰ ppm ید، ۰/۱ ppm سلنیوم، ۵۰×۱۰۵ واحد بین المللی ویتامین A، ۱۰×۱۰۵ واحد بین المللی ویتامین D و ۰/۱ گرم ویتامین E در هر کیلوگرم مکمل.

1- Contained 196 g Ca, 96 g P, 71 g Na, 19 g Mg, 3 g Fe, 0.3 g Cu, 2 g Mn, 3 g Zn, 100 ppm Co, 100 ppm I, 0.1 ppm Se and 50 × 105 IU of vitamin A, 10 × 105 IU of vitamin D and 0.1 g of vitamin E/kg.

سلول با مژک‌ها پوشیده شده است، یا مژک‌ها فقط در یک یا چندین ناحیه متفاوت وجود داشته باشد. تعداد و موقعیت مناطق مژکدار. شکل عمومی سلول واندازه آن، شامل نسبت طول به عرض. وجود هسته یا هستک. موقعیت منفذ دهانی. موقعیت، اندازه و تعداد صفحه‌های اسکلتی در صورت وجود.

در نهایت برای محاسبه کردن تعداد پروتوزوآها در هر میلی لیتر مایع شکمبه از فرمول زیر استفاده شد:

تعداد پروتوزوآها در هر میلی لیتر مایع شکمبه= $(۵ \times n \times ۱۰^{۳}) / ۰/۱\ mm^{۳}$

که در این رابطه عدد ۵ بیانگر رقت مورد استفاده در روش، n بیانگر تعداد پروتوزوآی شمارش شده، $۱۰^{۳}$ بیانگر $۱mm^{۳} = ۱۰^{۳}\ ml$ و $۰/۱mm^{۳}$ بیانگر مناطق شمارش شده (عمق $۰/۱\ mm \times ۱mm^{۲}$) می‌باشد.

جمع‌آوری ادرار و اندازه‌گیری پروتئین میکروبی ساخته شده به روش مشتقات پورینی:

اندازه‌گیری مشتقات پورینی شامل آلانتوئین، اسیداوریک، گزانتین و هیپوگزانتین مطابق روش چن و گومز (۱۹۹۵) صورت گرفت (۸). ادرار طی ۳ روز متوالی هر دوره در سطل‌های زیر قفس‌های متابولیک جمع آوری می‌شد. به‌علت آلودگی ادرار جمع آوری شده با مدفوع و محیط تنها حجم ادرار ثبت می شد و نمونه‌گیری ادرار ۲ تا ۳ بار در هر روز و به مدت ۳ روز از هر دام مستقیم صورت می‌گرفت و به حجم ۱:۱ با آب رقیق و pH آن با ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۷/۲ نرمال به زیر ۳ رسانده می‌شد (۱۷). برای جلوگیری از آلودگی بیشتر ادرار با مدفوع از کیسه‌های جمع‌آوری مدفوع (همانند کیسه‌های مورد استفاده در آزمایشات تعیین قابلیت هضم می‌باشد و این امکان را ایجاد می‌نماید مدفوع بدون ریختن در کف قفس‌های متابولیکی و ترکیب با ادرار در آن کیسه جمع آوری گردد) نیز در طول دوره نمونه برداری استفاده شد و در زمان نمونه برداری مستقیم نیز به وسیله اعمال شوک تنفسی (جلوگیری از تنفس دام به وسیله گرفتن بینی و دهان دام به مدت ۱۰ الی ۲۰ ثانیه که سبب ایجاد شوک تنفسی شده و دام ظرف مدت ۳۰ الی ۶۰ ثانیه اقدام به دفع ادرار می‌نماید)، نمونه ادرار بدون آلودگی جمع آوری می‌شد. نمونه‌ها در فریزر تا زمان اندازه‌گیری نگه‌داری شدند. پس از یخ‌گشایی نمونه‌ها، از ۳ روز نمونه برای هر گوسفند در هر دوره یک نمونه ادرار بر اساس نسبت حجمی ادرار تولیدی ۳ روز محاسبه شد.

محاسبه مقدار آلانتوئین به روش رنگ‌سنجی و در طول موج ۵۲۲ نانومتر و اندازه‌گیری گزانتین و هیپوگزانتین با روش آنزیمی و دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۲۹۳ نانو متر انجام شد (۸). تعیین غلظت اسیداوریک نمونه‌ها به روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت بیوشیمیایی پارس‌آزمون انجام

شد.

معادله ذیل برای محاسبه پورین‌های جذب شده و ازت میکروبی تولید شده در گوسفند، استفاده گردید (۸).

$$y=۰/۸۴\ x+(۰/۱۵\ w^{۰/۷۵}\ e^{-۲۵\ x})$$

$$\text{نیتروژن میکروبی (گرم در روز)} = \frac{۷۰X}{۰/۸۳ \times ۰/۱۱۶ \times ۱۰۰۰}$$

در معادله اول: y=مشتق پورینی دفع شده، x= پورین‌های جذب شده، w= وزن متابولیکی و e= عدد نپرین (۲/۷۱۸) و در معادله دوم ۰/۸۳= قابلیت هضم پورین میکروبی و ۷۰= مقدار ازت موجود در پورین‌ها (میلی‌گرم بر میلی‌مول)، ۰/۱۱۶= نسبت ازت پورینی به کل ازت موجود در میکروب‌های شکمبه.

در نهایت پروتئین میکروبی با حاصل ضرب نیتروژن میکروبی در ۶/۲۵ محاسبه شد. این تحقیق با استفاده از طرح مربع لاتین و به صورت چرخشی متوازن با ۳ تیمار غذایی و ۳ دوره ۲۴ روزه انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش با رویه میکس شده نرم‌افزار SAS ویرایش ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. لازم به ذکر است برای آنالیز آماری مورد استفاده از ساختارهای (کو)واریانس زیر استفاده شد:

۱- Variance Components = (VC)

۲- Autoregressive(1) = (AR(1))

۳- Compound Symmetry = (CS)

که در نهایت برای انتخاب بهترین ساختار از معیار اطلاعات آکائیک[1]، به گونه‌ایکه کمترین میزان عددی به‌دست آمده از ساختارها مطلوب‌تر می باشد، استفاده شد.

نتایج و بحث

اکوسیستم شکمبه (pH، نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار): نتایج نشان داد که تیمارهای مختلف آزمایشی اثری بر pH، کل اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی شکمبه نداشتند (جدول ۲).

1. AIC: Akaike's information criterion

جدول ۲- pH، نیتروژن آمونیاکی و ک ل اسیدهای چرب فرار شکمبه

Table 2. pH, Ammonia and Total volatile fatty acids

صفات مورد اندازه‌گیری Item	جیره‌های مورد آزمایش Treatment diets			خطای استاندارد SEM	*P- value*
	شاهد control	دانه گلرنگ خام Raw safflower seed	دانه گلرنگ فرآوری شده با مایکروویو Microwave irradiated safflower seed		
پی‌اچ pH	6.21	6.23	6.14	0.044	0.397
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در لیتر) NH_3-N (mg l^{-1})	87.30	83.50	82.66	2.535	0.438
کل اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول در لیتر) Total VFA (mmol l^{-1})	106.1	101.6	108.8	4.409	0.544

دی‌اس‌شاک و همکاران (۲۰۱۱)، تأثیر افزودن دو واریته مختلف دانه گلرنگ به میزان ۳ درصد ماده خشک جیره بر میزان pH، نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار کل را غیر معنی دار گزارش کردند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (۱۰). نتایج مشابه دیگری در اثر تغذیه دانه‌های روغنی از قبیل دانه گلرنگ و عدم تغییر در میزان pH، نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار کل (۱)، تخم پنبه غلطک خورده (۴)، دانه سویای کامل (۳۲) و دانه کانولا (۱۶، ۲۴) مشاهده شد.

ایوان و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند با افزودن اسید لینولئیک، اسید لینولنیک و ترکیب این دو در جیره غذایی گاوهای شیرده، گزارش کردند که تغییر معنی داری در میزان pH، نیتروژن آمونیاکی شکمبه و کل اسیدهای چرب مشاهده نشد (۲۱) و با در نظر گرفتن این موضوع که دانه گلرنگ دارای اسید چرب لینولئیک بسیار بالایی می باشد، نتایج گزارش شده توسط ایوان و همکاران (۲۰۱۳) با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. هرچند این محققین گزارش کردند که با وجود عدم تغییر معنی دار میزان کل اسیدهای چرب فرار شکمبه در اثر افزودن اسید لینولئیک به جیره سبب افزایش معنی دار اسید پروپیونیک شکمبه و کاهش غیر معنی دار غلظت اسید استیک شکمبه شده است. در همین راستا گونتیر و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر افزودن دانه روغنی کتان خام، اکسترود شده و میکرونیز شده به میزان ۱۲ درصد ماده خشک جیره بر میزان pH، نیتروژن آمونیاکی شکمبه و کل اسیدهای چرب فرار را غیر معنی دار گزارش کردند (۱۲).

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت پروتوزوآیی شکمبه: در این آزمایش تأثیر افـزودن دانـه روغنـی گلرنگ خام و فرآوری شـده بـا مـایکروویو بـر جمعیـت کـل پروتـوزوآیی و دو جـنس انتودینیـوم و دیپلودینیوم شکمبه مورد تحقیق قرار گرفتند که نتایج حاصل در جدول شماره ۳ گـزارش شـده اسـت. تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری روی جمعیت پروتوزوآیی شکمبه داشتند (P<۰/۰۵). با توجـه بـه نتایج، افزودن دانه روغنی گلرنگ خام و فرآوری شده با مایکروویو موجب کـاهش معنـی‌دار جمعیـت کل پروتوزوآیی شکمبه شده است ولی تفاوت معنی داری بین تیمارهای گلرنگ خام و فـرآوری شـده مشاهده نشد. نتایج نشان می دهد تغذیه دانه گلرنگ فرآوری شده با مایکروویو موجب کـاهش معنـی دار جمعیت جنس انتودینیوم شده است. همچنین بـا بررسـی نتـایج حاصـل مشـخص گردیـد جـنس دیپلودینیوم تحت تأثیر معنی دار تیمارها (تغذیه دانه روغنی خام و فرآوری شده) قرار نگرفته است.

جدول ۳- جمعیت پروتوزوآیی شکمبه (تعداد × ۱۰^۶ در هر میلی‌لیتر)

Table 3. Rumen protozoa population ($n\times10^6$ ml^{-1})

جیره‌های مورد آزمایش Treatment diets					
صفات مورد اندازه‌گیری Item	شاهد control	دانه گلرنگ خام Raw safflower seed	دانه گلرنگ فرآوری شده با مایکروویو Microwave irradiated safflower seed	خطای استاندارد SEM	*P- value*
کل پروتوزوآ Total Protozoa	8.293^{a}	7.473^{b}	7.610^{b}	0.180	0.038
انتودینیوم *Entodinium*	7.436^{a}	6.713^{ab}	6.636^{b}	0.219	0.042
دیپلودینیوم *Diplodinium*	0.690	0.603	0.630	0.039	0.346

حروف غیر متشابه در هر ردیف نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد. (P<۰/۰۵).

Values with differing letters within the same rows are significantly different (P<0.05).

چربی جیره، از جمله اسیدهای چرب ۱۸ کربنه، برای جمعیت پروتوزوآیی شکمبه مضر و سمی می‌باشد (۱۱، ۳۰) و گزارشات متعددی از کاهش جمعیت پروتوزوآیی شکمبه در اثر تغذیه دانه‌های روغنی به صورت *in vivo* (۹، ۲۳) و *in vitro* (۱۴، ۱۵) وجود دارد.

ایوان و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند افزودن اسید لینولئیک، اسید لینولنیک و ترکیبی از ایـن دو به جیره غذایی گاوهای شیری، جمعیت پروتوزوآیی مژکدار شکمبه کاهش پیدا کرده است (P<۰/۰۵).

این محققین گزارش کردند که بیشترین تعداد جمعیت پروتوزآیی شکمبه به ترتیب برای جیره شاهد (جیره پایه بدون افزودنی اسیدهای چرب)، جیره حاوی اسید لینولنیک، جیره حاوی اسید چرب لینولئیک و جیره حاوی مخلوط این دو اسید چرب بود و این محققین گزارش کردند که جمعیت پروتوزوآیی بیشتر به میزان اسید لینولئیک جیره حساسیت دارد (۲۱).

باه و همکاران (۲۰۰۷) با اضافه کردن روغن گلرنگ به میزان ۲/۷ درصد ماده خشک جیره تلیسه-های جرزی گزارش کردند جمعیت پروتوزوآیی شکمبه تحت تأثیر شدید روغن گلرنگ قرار گرفته (P<۰/۰۵) و میزان آن به اندازه یک لگاریتم کاهش پیدا کرده است ($۱/۸۷ \times ۱۰^{۶}$ در مقابل $۰/۸۶ \times ۱۰^{۶}$ پروتوزوآ در میلی‌لیتر مایع شکمبه). این محققین وجود میزان بالای اسید لینولئیک روغن گلرنگ را دلیل اصلی کاهش جمعیت پروتوزوآیی نامیده‌اند و از اسید لینولئیک بعنوان یک عامل ضد پروتوزوا قوی یاد کرده‌اند (۳).

ایوان و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند حساسیت پروتوزوآها به چربی جیره در بین گونه‌های پروتوزوآیی شکمبه متفاوت است به گونه‌ایکه پروتوزوآهای دارای فعالیت سلولایتیک، حساسیت بیشتری به چربی و میزان اسید لینولئیک جیره دارند که از این دست پروتوزوآها می توان به جنس انتودینیوم اشاره کرد که حساسیت بسیار بالایی به میزان چربی و اسید لینولئیک جیره دارند (۲۱).

با توجه به نتایج ایوان و همکاران (۲۰۱۳) و باه وهمکاران (۲۰۰۷) و با در نظر گرفتن این موضوع که اسید چرب غالب در دانه گلرنگ، اسید چرب اسید لینولئیک می‌باشد نتایج حاصل از این تحقیق مورد قبول به نظر می‌رسد (۲۱، ۳).

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر سنتز پروتئین میکروبی: تأثیر افزودن دانه روغنی گلرنگ خام و فرآوری شده با مایکروویو بر میزان دفع مشتقات پورین و همچنین سنتز نیتروژن میکروبی در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. پورین دفعی، جذبی و نیتروژن میکروبی وارد شده به دوازدهه تحت تأثیر جیره‌های مختلف قرار گرفت (P<۰/۰۵). در بین مشتقات پورین، آلانتوئین بیشترین سهم را داشت و تغذیه جیره فاقد دانه روغنی گلرنگ سبب بیش‌ترین دفع آلانتوئین شد. در مورد اسید اوریک و گزانتین و هیپو گزانتین نتایج مشابهی مشاهده شد به طوری‌که افزودن دانه روغنی گلرنگ فرآوری شده با مایکروویو دفع اسید اوریک را کاهش داد (P<۰/۰۵) ولی تغذیه تیمارهای مختلف تأثیر معنی-داری بر میزان دفع گزانتین و هیپوگزانتین نداشت.

پورین‌های موجود در خوراک‌های نشخوارکنندگان پایین است و این مقدار کم پورین‌ها نیز در شکمبه طی تخمیر باکتریایی تجزیه می‌شوند، بنابراین اسید نوکلئیک‌هایی که شکمبه را ترک می‌کنند اکثرا منشاء میکروبی دارند. بخش مهمی از پورین‌ها جذب شده و پس از تجزیه به شکل مشتقات پورین از طریق ادرار دفع می‌شوند. در نشخوارکنندگان آلانتوئین مهم‌ترین محصول کاتابولیسم پورین و مشتق اصلی دفع شده در ادرار است (۳۴). در پژوهش حاضر مشتقات پورینی دفع شده در ادرار تقریبا شامل ۷۳/۸ درصد آلانتوئین، ۲۲ درصد گزانتین و هیپوگزانتین و ۴/۲ درصد اسید اوریک می‌باشد که با یافته‌های موپانگوا و همکاران (۲۰۰۰) تطابق دارد (۲۸). در تحقیق حاضر در تیمارهای حاوی دانه روغنی گلرنگ خام و فرآوری شده به علت این‌که تولید پروتئین میکروبی کم بوده است در نتیجه دفع مشتقات پورینی و متعاقب آن پورین جذب شده نیز کاهش یافته است. به دنبال افزایش دفع مشتقات پورین و پورین‌های جذب شده در جیره فاقد دانه روغنی، نیتروژن میکروبی وارد شده به دوازدهه از ۳/۴۹۹ به ۴/۶۱۱ گرم در روز افزایش یافت.

جدول ۴- میانگین مشتقات پورین، پورین‌های جذب شده (میلی‌مول در روز) و نیتروژن میکروبی (گرم در روز)

Table 4. Purine derivatives, absorbed purine derivatives (mmol d^{-1}) and microbial nitrogen (g d-1)

صفات مورد اندازه‌گیری Item	جیره‌های مورد آزمایش Treatment diets			خطای استاندارد SEM	*P- value*
	شاهد control	دانه گلرنگ خام Raw safflower seed	دانه گلرنگ فرآوری شده با مایکروویو Microwave irradiated safflower seed		
آلانتوئین Allantoin	4.300^{a}	3.403^{b}	3.373^{b}	0.116	0.002
گزانتین + هیپوگزانتین Xanthine + hypoxanthine	1.283	1.196	1.166	0.0398	0.185
اسید اوریک Uric acid	0.243^{a}	0.216^{ab}	0.206^{b}	0.0098	0.054
کل مشتقات پورینی Total purine derivatives	5.826^{a}	4.787^{b}	4.776^{b}	0.1639	0.006
پورین‌های جذب شده Absorbed purines	6.342^{a}	4.830^{b}	4.813^{b}	0.2465	0.007
نیتروژن میکروبی وارد شده به دوازدهه Microbial nitrogen flow to duodenum	4.611^{a}	3.511^{b}	3.499^{b}	0.1789	0.007

حروف غیر متشابه در هر ردیف نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد. (P<۰/۰۵).

Values with differing letters within the same rows are significantly different (P<0.05).

چن و گوئست (۱۹۹۲) گزارش کردند که نیتروژن میکروبی وارد شده به دوازدهه گوسفند بین ۱/۸ تا ۱۵/۲ گرم در روز متغیر است که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد (۷).

میزان سنتز پروتئین میکروبی و مؤثر بودن تیمارها بر میزان آن‌را می‌توان از دو دیدگاه بررسی نمود، یکی تأثیر تیمارها بر جمعیت پروتوزوآیی و دیگری سمی بودن اسیدهای چرب ۱۸ کربنه غیر اشباع (اسید چرب غالب در دانه گلرنگ مورد آزمایش) بر جمعیت خود باکتریایی.

گزارش شده است در نشخوارکنندگانی که در شکمبه آن‌ها جمعیت پروتوزوآیی وجود ندارد و حذف جمعیت پروتوزوآیی شکمبه صورت گرفته است و یا کاهش شدید جمعیت پروتوزوآیی شکمبه صورت گرفته است، موجب افزایش میزان سنتز و رسیدن پروتئین میکروبی به دوازدهه شده است (۳۳، ۱۹، ۲۲). در تحقیق حاضر با وجود کاهش جمعیت پروتوزوآیی شکمبه، میزان پروتئین میکروبی کاهش پیدا کرده است که این اختلاف نتایج تحقیق حاضر با گزارشات ذکر شده می‌تواند در اثر اختلاف در میزان شدت کاهش جمعیت پروتوزوآیی در تحقیقات مختلف باشد. به گونه‌ای‌که ایوان (۲۰۰۹) افزایش پروتئین میکروبی را در اثر حذف کامل جمعیت پروتوزوآیی گزارش کرده است (۲۰).

گونتیر و همکاران (۲۰۰۵) با افزودن دانه کتان خام، میکرونیز شده و اکسترود شده به میزان ۱۲/۵ درصد ماده خشک به جیره غذایی گاوهای شیری گزارش کردند که افزودن این دانه روغنی سبب کاهش در میزان پروتئین میکروبی وارد شده به دوازدهه می‌شود ($P<۰/۰۵$) ولی اعمال فرآوری اکسترود کردن و میکرونیزه کردن تأثیر معنی دار بر میزان پروتئین میکروبی وارد شده به دوازدهه ندارد (در مقایسه با دانه کتان خام) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. این محققین دلیل کاهش سنتز پروتئین میکروبی را کاهش در جمعیت باکتریایی شکمبه در اثر تغذیه دانه روغنی عنوان کرده است (۱۲).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع با در نظر گرفتن نتایج حاصل می‌توان عنوان نمود که مصرف دانه گلرنگ خام و فرآرری شده با مایکروویو به عنوان یک منبع انرژی، اسیدهای چرب ضروری (خصوصاً اسید لینولئیک) و به میزان ۴ درصد ماده خشک جیره، تأثیر منفی بر اکوسیستم شکمبه از قبیل pH و اسیدهای چرب فرار نداشته و با درنظر گرفتن میزان کاهش تولید پروتئین میکروبی در شکمبه و

رسیده به روده و اعمال آن در تنظیم جیره غذایی، می‌توان از دانه گلرنگ به‌عنوان یک دانه روغنی با ارزش در تغذیه نشخوارکنندگان استفاده نمود.

منابع

1. Alizadeh, A.R., Ghorbani, G.R., Alikhani, M., Rahmani, H.R. and Nikkhah, A. 2010. Safflower seeds in corn silage and alfalfa hay based early lactation diets: A practice within an optimum forage choice. Anim. Feed Sci. Technol. 155: 18–24.
2. Azadmard-Damirch, S., Habibi, F., Hesari, J., Nemati, M. and Fathi, B. 2010. Effect of pretretment with microwawe on oxidative stability and nutraceuticals content of oil from rapeseed. Food Chem. 121: 1211-1215.
3. Baah, J., Ivan, M., Hristov, A.N., Koenig, K.M., Rode, L.M. and Mcallister, T.A. 2007. Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. Anim. Feed Sci. Tech. 137: 126-137.
4. Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Benchaar, C. and Holtshausen, L. 2009. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. J. Dairy Sci. 92:2118–2127.
5. Broderick, G.A. and Kang, J.H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. J. Dairy Sci. 63:64–75.
6. Caramona, P.M. 2004. Effects of high linoleic safflower seeds supplementation on conjugated linoleic acid concentration in milk fat and benefic outcome for human health. MSC thesis. Utah state university, Logan.
7. Chen, X.B. and Goest, M.J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives. An overview of the technical details Rowet Research Institute, Buksburn Aberdeen, AB2 9SB, U.K.
8. Chen, X.B. and Gomes, M.J. 1995. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine diversity – an overview of the technical details. International Feed Resources Unit, Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen AB2 9SB, UK.
9. Clemens, E., Woods, W. and Arthaud, V. 1974. The effect of feeding unsaturated fats as influenced by gelatinized corn and by the presence and absence of rumen protozoa. I. Serum lipid composition. J. Anim. Sci. 38: 634–639.
10. Dschaak, C.M., Noviandi, C.T. Eun, J.S., Fellner, V., Young, A.J., ZoBell D.R. and Israelsen, C.E. 2011. Ruminal fermentation, milk fatty acid profiles, and productive performance of Holstein dairy cows fed 2 different safflower seeds. J. Dairy Sci. 94: 5138-5150.

11. Girard, V. and Hawke, J.C. 1978. The role of Holotrichs in the metabolism of dietary linoleic acid in the rumen. Biochim. Biophys. Acta. 528: 17–27.
12. Gonthier, C., Mustafa, A.F., Ouellet, D.R., Chouinard, P.Y., Berthiaume, R. and Petit, H.V. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: Effects on blood parameters and milk fatty acid composition. J. Dairy Sci. 88: 748–756.
13. Habiba, R.A. 2002. Change in anti-nutrients, protein solubility, digestibility and HCL extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. Food chem. 77: 187-192.
14. Hristov, A.N., Ivan, M. and 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. J. Anim. Sci. 82: 2693-2704.
15. Hristov, A.N. and Jouany, J.P. 2005. Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen. In: Pfeffer, E., Hristov, A.N. (Eds.), Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle: Reducing the Environmental Impact of Cattle Operations. CAB International. Pp: 117–166.
16. Hussein, H.S., Merchen, N.R. and Fahey, G.C. 1995. Effects of forage level and canola seed supplementation on site and extent of digestion of organic matter, carbohydrates, and energy by steers. J. Anim. Sci. 73: 2458–2468.
17. Jetanaa, T., Abdullahb, N., Halimc, R.A., Jalaludind S. and Ho, Y.W. 2000. Effects of energy and protein supplementation on microbial-N synthesis and allantoin excretion in sheep fed guinea grass. Anim. Feed Sci. Technol. 84: 167–181.
18. Ikwuegbua, O.A. and Suttona, J.D. 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. Br. J. Nutrition. 48: 365-375.
19. Ivan, M., Hidiroglou, M. and Petit, H.V. 1991. Duodenal flow of nitrogen following protozoal inoculation of fauna-free sheep fed a diet supplemented with casein or soybean meal. Can. J. Anim. Sci. 71: 793–801.
20. Ivan, M. 2009. Comparison of duodenal flow and digestibility in fauna-free sheep and in sheep inoculated with Holotrich protozoa, *Entodinium monofauna* or total mixed protozoa population. Br. J. Nutrition. 101: 34–40.
21. Ivan, M., Petit, H.V., Chiquette, J. and Wright, A.D.G. 2013. Rumen fermentation and microbial population in lactating dairy cows receiving diets containing oilseeds rich in C-18 fatty acids. Brit. J. Nutrition. 109: 1211–1218.
22. Ivan, M., Neill, L. and Entz, T. 2000. Ruminal fermentation and duodenal flow following progressive inoculations of fauna free withers with major individual species of ciliate protozoa or total fauna. J. Anim. Sci. 78: 750–759.
23. Ivan, M., Mir P.S., Mir, Z., Entz, T., He, M.L. and McAllister, T.A. 2004. Effects of dietary sunflower seeds on rumen protozoa and growth of lambs. Br. J. Nutrition. 92: 303–310.

24. Khorasani, G.R. and Kennelly, J.J. 1998. Effect of added dietary fat on performance, rumen characteristics, and plasma metabolites of midlactation dairy cows. J. Dairy Sci. 81: 2459–2468.
25. Kim, E.O., Lee, J.Y. and Choi, S.W. 2006. Quantitative Changes in phenolic compounds of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seeds during growth and processing. J. Food Sci. Nutr. 11: 311-317.
26. Markham, R. 1942. A steam distillation apparatus suitable for micro-kjeldahl analysis. Biochem. J. 36: 790–791.
27. Mermelstein, N.H. 1997. How food technology covered microwaves over the years. Food Technol. 51: 82–84.
28. Mupangwa, J.F., Ngongoni, N.T., Topps, J.H., Acamovis, T., Hamudikuwanda, H. and Ndlovu L.R. 2000. Dry matter intake, apparent digestibility and excretion of purine derivaitives in sheep fed tropical legume hay. J. Small Ruminants Res. 36: 261-268.
29. National Research Council. 1985. Nutrient Requirements of Sheep. The National Academies Press.
30. Newbold, C.J. and Chamberlain, D.J. 1988. Lipids as rumen defaunating agents. Proc Nutr Soc. 47: 154A.
31. Ogimoto, K. and Imai, S. 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Societies Press.
32. Schauff D.J., Ellioit, J.P., Clark, J.H. and Drackley, J.K. 1992. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing whole soybeans and tallow. J. Dairy Sci. 75:1923-1935.
33. Veira, D.M., Ivan, M. and Jui, P.Y. 1983. Rumen ciliate protozoa: effects on digestion in the stomach of sheep. J. Dairy Sci. 66: 1015–1022.
34. Yu, P., Eng, A.R., Boon-ek, L. and Leury, B.J. 2002. Purine derivative excretion and ruminal microbial yield in growing lambs fed raw a dry roasted legume seeds as protein supplemented. J. Anim. Feed Sci. Technol. 95:33-48.
35. Zhao, S., Xiong, S., Qiu, C. and Xu, Y. 2007. Effect of microwaves on rice quality. J. Stored prod. Res. 43: 496–502.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 3(3), 2015
http://ejrr.gau.ac.ir

Protozoa population and production of microbial protein in sheep fed microwave irradiated safflower seed

[*]H. Paya[1], A. Taghizadeh[2], H. Janmohammadi[3], Gh.A. Moghadam[2] and A. Hosseinkhani[3]
[1]Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University,
[2]Professor, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University,
[3]Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University
Received: 08/28/2015; Accepted: 12/27/2015

Abstract

Background and objectives: Based on studies, safflower seeds contain highest levels of linoleic acid among other oilseeds and are produced in certain regions of Iran. Importance of processing of oilseeds and beneficial effects of microwave irradiation processing and its influence on rumen ecosystem is known, therefore this study carried out to determine the effects of adding raw and microwaved safflower seed on rumen ecosystem.

Materials and methods: Three rumenaly fistulated sheep were used for determination of the effect of adding raw and microwaved safflower seed on rumen ecosystem such as rumen pH, ammonia-N, total volatile fatty acid, protozoa population and rumen microbial protein yielding. This experiment carried out in three period and each period lasted 24 days, 21 days for adaptation and 3 days for data collection. Total volatile fatty acid, ammonia-N, protozoa population and rumen microbial protein yielding were determined by Markham steel, spectrophotometer, neobar lam and purine derivative excretion, respectively.

Results: Adding raw and treated safflower seed hadn't any significant effect on rumen pH, ammonia-N and total volatile fatty acid but adding raw and treated safflower seed decreased ruminal protozoa population ($P<0.05$). Feeding microwaved safflower decreased rumen entodinium population ($P<0.05$) but adding raw and microwaved safflower seed had no effect on rumen diplodinium population. The results showed that microbial nitrogen supplied to the duodenum,

[*]Corresponding author; hamid.paya@tabrizu.ac.ir

purine derivatives and purine absorption decreased by adding microwaved safflower seed (P<0.05).

Conclusion: Results show that inclusion of safflower seed up to 4% of diet dry matter had no effect on rumen ecosystem such as pH, total volatile fatty acid and ammonia-N, so we can use safflower seed in sheep and ruminant diets as valuable oil seed.

Keywords: Safflower seed, Microwave, rumen ecosystem, Protozoa, Microbial Protein