

آثار متقابل سطح کنسانتره و مدت مصرف جیره پرواری بر تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر و غلظت اسیدهای چرب فرار در شرایط برون‌تنی

نسیم کاکي^۱، علی کیانی^{۲*} و ایوب عزیزی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۲۴)

چکیده

هدف این پژوهش بررسی اثرات متقابل سطح کنسانتره و مدت زمان مصرف جیره بر تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر، جمعیت پروتوزوا و غلظت اسیدهای چرب فرار در شرایط برون‌تنی بود. تعداد ۲۷ رأس بره نر نژاد لری (۲۶±۵ کیلوگرم) با سه جیره آزمایشی با سه سطح کنسانتره ۵۵، ۷۰ و ۸۵ درصد به مدت ۱۰۰ روز پروار شدند (۹ راس برای هر جیره). مصادف با روزهای ۷۰ و ۱۰۰ دوره پروار مایع شکمبه بره‌های هر گروه از طریق سوند مری تهیه و مخلوط شد و برای آزمایش تولید گاز جیره در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. نتایج نشان داد که نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت) تحت تأثیر سطح کنسانتره و مدت مصرف جیره قرار نگرفت ($P > 0.05$). گوارش‌پذیری ماده آلی با افزایش سطح کنسانتره افزایش یافت ($P < 0.05$) ولی با طولانی‌تر شدن مدت مصرف جیره کاهش یافت ($P < 0.05$). غلظت نیترोजن آمونیاکی شکمبه با افزایش درصد کنسانتره و با طولانی‌تر شدن مدت مصرف جیره افزایش یافت ($P < 0.05$). جمعیت پروتوزوا و غلظت کل اسیدهای چرب فرار در جیره ۸۵ درصد کنسانتره بیشتر از دو جیره دیگر بود ($P < 0.05$). با طولانی‌تر شدن مدت مصرف جیره اسید پروپیونیک و اسید ایزوبوتیریک کاهش ($P < 0.05$) و در مقابل اسید استیک، اسید ایزوالریک افزایش یافت ($P < 0.05$). اثرات متقابل معنی‌داری بین سطح کنسانتره و مدت مصرف جیره برای گاز تولیدی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک مشاهده شد ($P < 0.05$). نتیجه کلی این‌که، کوتاه‌تر شدن دوره پروار وقتی بره‌ها با جیره پرکنسانتره تغذیه می‌شوند ممکن است در بهبود فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای بره‌های پرواری مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آزمون تولید گاز، اسیدهای چرب زنجیر کوتاه، بره پرواری، نیترोजن آمونیاکی.

Interaction effects of concentrate level and duration of fattening period in lambs on *in vitro* gas production, fermentation parameters, and volatile fatty acid concentration

Nasim Kaki¹, Ali Kiani^{2*} and Ayoob Azizi³

1, 2, 3. M.Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received: May 12, 2019 - Accepted: Sep. 15, 2019)

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of levels of concentrate and duration of fattening period in lambs on *in vitro* gas production (GP), fermentation parameters, protozoa number, and volatile fatty acid (VFA) concentration. Twenty-seven Lori male lambs (26±5 kg BW) were fed with three experimental diets (55, 70 and 85% concentrate) for 100 days (9 lambs for each). At 70 and 100 days of fattening period, ruminal fluids from lambs in each group were collected by the esophagus tube. The mixed ruminal fluids were used for *In vitro* GP test. Results showed that potential (b) and rate (c) of GP were affected neither by level of concentrate nor by duration of consumption of diets ($P > 0.05$). Organic matter digestibility of diets increased ($P < 0.05$) by increasing concentrate level; however it was decreased ($P < 0.05$) by duration of fattening period. The NH₃-N concentration increased ($P < 0.05$) by increasing the concentration level and duration of the fattening period of the diets. Number of protozoa and total VFA concentration in diet containing 85% concentrate was higher ($P < 0.05$) than those with 55 and 75% concentrate. With the extension of fattening period, propionic acid, and iso-butyric acid decreased ($P < 0.05$), while the acetic acid, iso-valeric acid decreased ($P < 0.05$). Interaction effects of concentrate level and duration of fattening on GP after 24 h of incubation, propionic acid, and butyric acid were observed ($P < 0.05$). In conclusion, reducing the fattening period when lambs fed a high concentrate diet may exert beneficial effects on rumen fermentation parameters.

Keywords: Fattening lambs, *In vitro* gas test, NH₃-N, short chain fatty acids.

* Corresponding author E-mail: kiani.a@lu.ac.ir

مقدمه

استفاده از جیره‌های پرکنسانتره در پرورابندی دام‌های نشخوارکننده با هدف بهبود عملکرد افزایش وزن به‌ازای مصرف هر واحد مصرف خوراک انجام می‌شود. افزایش مقدار کنسانتره جیره سبب بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن بره‌های پروراری (Papi & Mostafa-Tehrani, 2017)، افزایش تولید اسیدهای چرب فرآر می‌شود (Carro *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009). با این وجود، برخی آزمایشات بر روی دام زنده^۱ گزارش کرده‌اند که استفاده طولانی مدت از جیره‌های پرکنسانتره همواره با افزایش عملکرد همراه نیست (Norollahi *et al.*, 2007; Asadi *et al.*, 2016). در پژوهشی گوارش‌پذیری مواد مغذی در هنگام افزایش نسبت کنسانتره به علوفه جیره کاهش یافته است (Gudla *et al.*, 2012). Asadi *et al.* (2012) یک روند کاهش در توان هضمی و عملکردی بره‌های پروراری (افزایش ضریب تبدیل غذایی) دریافت کننده جیره پرکنسانتره (بالای ۸۰ درصد جیره) در ماه سوم پرورار در مقایسه با ماه اول پرورار را مشاهده کردند. از مدت‌ها پیش مشخص است که جیره‌های پرکنسانتره ضمن کاهش pH محیط شکمبه باعث کاهش جذب اسیدهای چرب فرآر (Hinders & Owen, 1965)، کراتینه شدن پرزهای شکمبه (Nocek & Kesler, 1980; Zitnan *et al.*, 2003)، کاهش تحرک شکمبه (Nocek & Owens, 1997)، تغییر در جمعیت باکتریایی شکمبه (Sun *et al.*, 2010)، تغییر در الگوی اسیدهای چرب فرآر (Gudla *et al.*, 2012) می‌شود. علی‌رغم وجود اطلاعات کافی در ارتباط با تأثیر مصرف جیره پرکنسانتره بر عملکرد دام‌های پروراری، اطلاعات اندکی در ارتباط با تأثیر طول مدت مصرف و همچنین اثرات متقابل بین سطح کنسانتره و مدت مصرف جیره در دام‌های پروراری وجود دارد. یکی از راه‌های بررسی تأثیر جیره بر اتفاقات محیط شکمبه و گوارش‌پذیری جیره استفاده از روش‌های برون‌تنی^۲ است. از نقاط ضعف روش‌های برون‌تنی که نیاز به مایع شکمبه جهت انکوباسیون دارند، یکسان‌نبودن

جیره مورد آزمایش با جیره دام‌های دهنده مایع شکمبه است. لذا تفسیر نتایج آزمایشات برون‌تنی بویژه زمانی که تأثیر مدت زمان مصرف جیره مورد بررسی است، عملاً مشکل است. در پژوهش حاضر سطوح مختلف کنسانتره در جیره‌های پروراری به‌طور همزمان در آزمایش مزرعه‌ای برای پرورار بره‌ها استفاده شد و اثرات متقابل بین سطح کنسانتره جیره و طول مدت مصرف جیره بر میزان تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر، گوارش‌پذیری مواد مغذی و جمعیت پروتوزوای شکمبه، غلظت اسیدهای چرب فرآر در دو زمان مختلف در شرایط برون‌تنی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

دام‌های مورد آزمایش و جیره‌های آزمایشی

تعداد ۲۷ رأس بره نر نژاد لری (میانگین وزن 26 ± 5 کیلوگرم، سن 4 ± 1 ماه) با سه جیره آزمایشی که دارای سه سطح مختلف کنسانتره با نسبت‌های ۵۵درصد، ۷۰درصد و ۸۵درصد بود به مدت ۱۰۰ روز تغذیه شد. دام‌ها در باکس‌های $1/5 \times 1/5$ متر نگهداری شدند و تغذیه آنها به‌صورت انفرادی انجام شد. جیره‌های غذایی براساس جدول احتیاجات غذایی نشخوارکنندگان کوچک (۲۰۰۷) محاسبه شد. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی بخش کنسانتره و جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ ارائه شده است. محتوی ماده خشک جیره‌ها با خشک‌کردن در آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای 103°C درجه سلسیوس، خاکستر خام با سوزاندن در کوره الکتریکی به مدت سه ساعت در دمای 550°C درجه سلسیوس و پروتئین خام با روش کجلدال تعیین شد (AOAC, 1990). الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) به‌روش ون‌سوست (Van Soest *et al.*, 1991) تعیین شد. انرژی قابل‌متابولیسم جیره با استفاده از اعداد ارائه شده در جداول کمیته تحقیقات ملی NRC (2007) محاسبه شد.

1. *In vivo*

2. *In vitro*

جدول ۱. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی بخش کنسانتره و جیره‌های آزمایشی انکوبه شده در شرایط آزمایشی (درصد ماده خشک یا واحد ذکر شده)

Table 1. Ingredients and chemical composition of concentrate and experimental diets incubated *in vitro* (% of dry matter or as stated)

Ingredients	Concentrate (g per kg DM)	Experimental diet (% of concentrate)		
		55	70	85
Alfalfa hay (dried)	-	45.0	30.0	15.0
Barley grain, ground	466	25.8	32.8	36.9
Corn grain, ground	186	10.4	13.3	16.1
Wheat bran	75	4.1	5.3	6.4
Soybean meal	233	12.6	16.1	19.5
Mineral and vitamin premix ¹	20	1.0	1.29	1.56
Sodium bicarbonate	15	0.74	0.94	1.15
Common salt	5	0.25	0.32	0.38
Chemical composition				
Dry matter (fresh weight)	897	88.9	89.1	89.4
Organic matter	95.2	94.3	94.9	95.5
Crude protein	180	16.2	16.8	17.4
Neutral detergent fiber (NDF)	179	37.5	31.6	25.7
Acid detergent fiber (ADF)	71	24.4	18.8	13.2
Metabolizable energy (MJ/kg DM)	12.3	10.5	11.1	11.7

۱. هر کیلوگرم مکمل مواد ویتامینی- معدنی دارای ۱۸۰ گرم کلسیم، ۷۰ گرم فسفر، ۳۵ گرم پتاسیم، ۵۰ گرم سدیم، ۵۸ گرم کلر، ۳۰ گرم منیزیم، ۳۲ گرم سولفور، ۵ گرم منگنز، ۴ گرم آهن، ۳ گرم روی، ۳۰۰ میلی‌گرم مس، ۱۰۰ میلی‌گرم ید، ۱۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۲۰ میلی‌گرم سلنیوم، ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E و ۳ گرم آنتی‌اکسیدان بود.
1. Contained (per kg): 180 g Ca, 70 g P, 35 g K, 50 g Na, 58 g Cl, 30 g Mg, 32 g S, 5 g Mn, 4g Fe, 300 mg Zn, 300 mg Cu, 100 mg I, 100 mg Co, 20 mg Se, 500000 IU Vitamin A, 100000 IU Vitamin D3, 100 IU Vitamin E, and 3 g Antioxidant.

آزمایش تولید گاز برون تنی

شد. به هر ویال شیشه‌ای مقدار پنج میلی‌لیتر مایع شکمبه صاف شده و ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی اضافه شد. ترکیب شیمیایی بزاق مصنوعی مورد استفاده شامل پتاسیم‌دی‌هیدروژن فسفات (۱۰ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم ۷/۵ (۰/۵ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۰/۵ گرم در لیتر) و کلرید کلسیم دو آب (۰/۱ گرم در لیتر) بود (Marten & Barnes, 1980). قبل از استفاده از محلول فوق، ابتدا pH آن توسط افزودن محلول دیگری به آن که مشتمل بر بیکربنات سدیم (۱۵ گرم در دسی‌لیتر) و سولفید سدیم ۹ آب (۱ گرم در دسی‌لیتر) بود، روی ۶/۸ تنظیم گردید (Marten & Barnes, 1980). در تمام مراحل انجام آزمایش گاز دی‌اکسیدکربن جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی به درون ویال‌های شیشه‌ای تزریق شد. درب ویال‌ها با استفاده از درپوش آلومینیومی پرس شد و جهت انکوباسیون در آن با دمای ۳۹ درجه سلسیوس قرار گرفت. فشار گاز تجمع یافته در هر ویال به کمک فشارسنج در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. سه ویال که تنها حاوی مایع شکمبه و بزاق مصنوعی بودند به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. حجم خالص گاز از تفاضل

آزمایش تولید گاز در دو نوبت در روزهای ۷۰ و ۱۰۰ همزمان با دوره پرور براساس روش Marten & Barnes (1980) انجام شد. مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم از هر یک از جیره‌های آزمایشی (با اندازه ذرات یک میلی‌متری) به دقت توزین شد و داخل ویال‌های شیشه‌ای ریخته شد. در هر دوره تعداد سه ران و در هر ران تعداد چهار تکرار (جمعاً ۱۲ تکرار) از هر جیره آزمایشی در نظر گرفته شد. در هر دوره تعداد ۳۶ ویال و در مجموع تعداد ویال‌های دو دوره ۷۲ ویال بود. مایع شکمبه مورد نیاز برای آزمایش برون تنی از بره‌های هر گروه آزمایشی (تعداد ۹ راس) با استفاده از سوندمری در روزهای ۷۰ و ۱۰۰ دوره پرور گرفته شد. مایع شکمبه سه ساعت پس از تغذیه صبحگاهی گرفته شد. برای جلوگیری از تأثیر بزاق بر pH مایع شکمبه، نخستین نمونه گرفته شده دورریخته شد. قبل از ریختن به داخل ویال‌های آزمایشگاهی، محتویات شکمبه با استفاده از چهار لایه پارچه پنیر صاف گردید. مایع شکمبه صاف شده مربوط به بره‌های هر جیره آزمایشی با هم کاملاً مخلوط شد و درون فلاسک آب گرم با دمای ۳۹ درجه سلسیوس سریعاً به آزمایشگاه منتقل

$$(۲) = \text{انرژی قابل متابولیسم} \\ + (۰/۰۵۷ \times (\text{میزان گاز تولیدی} \times ۰/۱۳۶) + ۲/۲) \\ + (\text{پروتئین خام} \times ۰/۰۰۲۹) + (\text{پروتئین خام})$$

که در این روابط محاسبات بر اساس گرم در کیلوگرم ماده خشک است. میزان گاز تولیدی برای ۲۰۰ میلی گرم سوبسترا پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون تصحیح شد. انرژی قابل متابولیسم بر اساس مگاژول در کیلوگرم ماده خشک محاسبه شد. ضریب تفکیک (شاخص مقدار سنتز پروتئین میکروبی) از ماده آلی تجزیه شده (میلی گرم) تقسیم بر گاز تولیدی (میلی لیتر) که مطابق با رابطه ۳ محاسبه شد (Blummel et al., 1997).

$$(۳) = \text{ضریب تفکیک} \\ \frac{\text{ماده آلی تجزیه شده در هر ویال (میلی گرم)}}{\text{گاز تولیدی (میلی لیتر)}}$$

جمعیت پروتوزوایی شکمبه

جهت شمارش جمعیت پروتوزوایی شکمبه، از محیط های کشت مخلوط میکروبی انکوبه شده داخل ویال های شیشه ای پس از ۱۶ ساعت نمونه گیری انجام شد و با حجم مساوی با فرمالین ۱۰ درصد مخلوط شد. جمعیت پروتوزوآ براساس روش Dehority (2003) با استفاده از میکروسکوپ نوری و لام هموسایتومتر شمارش شد.

تعیین غلظت اسیدهای چرب فرآر

غلظت اسیدهای چرب فرآر محتویات ویال ها بعد از ۱۶ ساعت انکوباسیون با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Fisons Instruments, HRGC mega 2, Milan, Italy) اندازه گیری شد. برنامه دمایی و دیگر مشخصات دستگاه به صورت زیر بود: دمای تزریق کننده و تشخیص دهنده دستگاه به ترتیب ۱۱۰ و ۲۰۰ درجه سلسیوس بود. گاز ناقل در این دستگاه هلیوم و تشخیص دهنده آن از نوع شعله یونی بود. دمای ستون دستگاه در آغاز ۱۱۰ درجه سلسیوس بود که به مدت ۲ دقیقه در این دما نگه داشته شد و سپس در طول پنج دقیقه به ۲۰۰ درجه سلسیوس افزایش یافت و در این دما باقی ماند. ستون مورد استفاده از نوع مویینه

میانگین گاز تولیدی ویال ها از گاز تولیدی ویال های بلانک محاسبه شد. پارامترهای تولید گاز با استفاده از رابطه $P = b(1 - e^{-ct})$ (Blummel et al., 2003) توسط نرم افزار SAS (2009) برازش شد. در این رابطه b نشان دهنده حجم گاز تولیدی از بخش تخمیرپذیر (میلی لیتر)، c نرخ تولید گاز در ساعت، t زمان انکوباسیون (برحسب ساعت) و P میزان گاز تولیدی (میلی لیتر) در زمان مورد نظر است.

تعیین فراسنجه های تخمیر

در زمان ۱۶ ساعت انکوباسیون تعداد چهار ویال از هر تیمار از روند انکوباسیون خارج شد. بعد از ثبت حجم گاز تولیدی، درب آن ها باز شده و pH محتویات ویال به وسیله دستگاه pH متر (مدل ۷۴۴؛ شرکت Metrohm سوئیس) تعیین شد. میزان دو میلی لیتر از محتویات ویال ها برای آنالیز اسیدهای چرب فرآر با مقدار ۰/۵ میلی لیتر اسید متافسفریک (۲۵ درصد) مخلوط شد و تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، محتوای هر ویال با ۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. از مایع شفاف رویی هر ویال (پنج میلی لیتر) سریعاً با یک میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال برای اندازه گیری نیتروژن آمونیاکی مخلوط شد و نمونه ها تا زمان اندازه گیری در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم در دسی لیتر) هر نمونه با روش معرف فنل- هیپوکلریت و با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر به روش Broderick & Kang (1980) تعیین شد. باقی مانده نمونه های هر ویال شیشه ای به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس آون خشک شد. درصد گوارش پذیری ظاهری ماده خشک از اختلاف وزن نمونه اولیه و نمونه پس از انکوباسیون ۱۶ ساعت محاسبه شد. میزان گوارش پذیری شکمبه ای ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم جیره های آزمایشی به ترتیب براساس روابط ۱ و ۲ تخمین زده شد (Menke & Steingass, 1988).

$$(۱) = \text{میزان گوارش پذیری ماده آلی} \\ + (\text{میزان گاز تولیدی} \times ۸/۸۹) + (۴/۵) + (۱۴۸/۸) \\ + (\text{خاکستر خام} \times ۶/۵) + (\text{خام})$$

($P > 0.05$). اثر متقابل بین مدت مصرف و سطح کنسانتره جیره برای فراسنجه‌های محاسباتی از تولید گاز ساعت ۱۶ شامل گوارش‌پذیری ماده‌آلی، انرژی قابل متابولیسم و مقدار اسیدهای چرب فرار تمایل به معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.01$). با افزایش سطح کنسانتره جیره گوارش‌پذیری ماده‌آلی و انرژی قابل متابولیسم جیره‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). گوارش‌پذیری ماده‌آلی، میزان انرژی قابل متابولیسم جیره‌ها بعد از ۱۰۰ روز مصرف در مقایسه با ۷۰ روز کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

اثر درصد کنسانتره و مدت‌زمان مصرف جیره بر غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH، ضریب تفکیک و جمعیت پروتوزوای شکمبه در شرایط برون‌تنی در جدول ۳ ارائه شده است. غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش درصد کنسانتره جیره و همچنین با طولانی‌تر شدن مدت مصرف جیره به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). با افزایش درصد کنسانتره جیره و با طولانی‌تر شدن مدت مصرف جیره، pH محتویات ویال‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). جمعیت پروتوزوایی در جیره حاوی ۸۵ درصد کنسانتره بیشتر از سایر جیره‌های آزمایشی بود ($P < 0.05$). ضریب تفکیک تحت تأثیر درصد کنسانتره و طول مدت مصرف جیره قرار نگرفت ($P > 0.05$). در ارتباط با پارامتر غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH، ضریب تفکیک و جمعیت پروتوزوای شکمبه اثر متقابل معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

تأثیر درصد کنسانتره و مدت‌زمان مصرف جیره بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه و نسبت اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول در ۱۰۰ میلی‌مول اسیدچرب فرار) در جدول ۴ نشان داده شده است. غلظت کل اسیدهای چرب فرار در جیره ۸۵ درصد کنسانتره بیشتر از دو سطح دیگر کنسانتره بود ($P < 0.05$). غلظت اسیدهای چرب فرار با افزایش مدت مصرف جیره افزایش یافت ($P < 0.05$). غلظت نسبی اسیدپروپیونیک و اسیدایزو-بوتیریک با طولانی‌تر شدن مدت مصرف جیره به طور معنی‌داری کاهش ($P < 0.05$) و در مقابل غلظت اسیداستیک، اسیدایزووالریک افزایش یافت ($P < 0.05$). با افزایش سطح کنسانتره جیره غلظت اسیدپروپیونیک افزایش یافت ($P < 0.05$). جیره ۸۵ درصد کنسانتره در

به طول ۳۰ متر بود (Alltech Capillary Column, ECTM 1000, length 30 meters, inside diameter 0.53 mm, film thickness 1 micron). ایزوکاپروئیک اسید به‌عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گرفت. غلظت هر یک از اسیدهای چرب فرار از تقسیم سطح زیر پیک آن اسیدچرب بر سطح زیر پیک مجموع اسیدهای چرب محاسبه و به درصدی از مجموع اسیدهای چرب فرار بیان شد.

تجزیه آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل ۳×۲ انجام شد. محاسبات مربوط به تبدیل فشار به حجم گاز تولیدی در نرم افزار Excel (2016) ثبت شد. داده‌ها با رویه مختلط با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (2009) تجزیه آماری شد. مدل آماری طرح آزمایشی $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + C_k + \varepsilon_{ijk}$ بود که A_i فاکتور سطح کنسانتره، B_j فاکتور مدت مصرف جیره، $(AB)_{ij}$ اثر متقابل سطح کنسانتره و مدت مصرف جیره، C_k اثر تصادفی دام و ε_{ijk} خطای آزمایشی بود. میانگین‌های با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای توکی در سطح معنی‌داری پنج درصد مقایسه شد.

نتایج

اثر متقابل درصد کنسانتره و مدت‌زمان مصرف جیره بر میزان تولید گاز در شرایط برون‌تنی در جدول ۲ آمده است. بین مدت زمان مصرف و درصد کنسانتره جیره در ارتباط با میزان گاز تولیدی بعد از ۲۴ ساعت اثر متقابل معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$). میزان گاز تولیدی در زمان‌های ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و همچنین مقدار کل گاز تولیدی در جیره حاوی ۸۵ درصد کنسانتره در مقایسه با جیره محتوی ۵۵ درصد کنسانتره بیشتر بود ($P < 0.05$). میزان گاز تولیدی دو جیره حاوی ۸۵ و ۵۵ درصد کنسانتره تحت تأثیر دوره مصرف قرار نگرفت ($P > 0.05$). درحالی‌که میزان گاز تولیدی جیره حاوی ۷۰ درصد کنسانتره بعد از ۱۰۰ روز در مقایسه با ۷۰ روز مصرف کاهش یافت ($P < 0.05$). نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت) در تمامی تیمارها یکسان بود و تحت تأثیر سطح کنسانتره جیره و مدت مصرف جیره قرار نگرفت

روز در هر سه جیره یکسان بود ولی در دوره ۱۰۰ روز این نسبت در جیره ۸۵ درصد کنسانتره نسبت به دو جیره دیگر کاهش معنی داری داشت ($P < 0.05$). غلظت اسیدپروپیونیک در جیره ۷۰ درصد در مدت ۷۰ روز در مقایسه با جیره ۵۵ درصد کنسانتره بیشتر بود ولی در دوره زمانی ۱۰۰ روز تفاوت معنی داری نداشت.

مقایسه با دو جیره دیگر دارای غلظت کمتری از اسیداستیک و درمقابل غلظت بالاتری از اسیدوالریک بود ($P < 0.05$). اثر متقابل معنی داری برای اسیدپروپیونیک و اسیدبوتیریک بین سطح کنسانتره و مدت مصرف جیره مشاهده شد (شکل ۱). نسبت اسیداستیک به اسیدپروپیونیک و همچنین اسیدبوتیریک در زمان ۷۰

جدول ۲. اثرات متقابل درصد کنسانتره و مدت مصرف جیره بر میزان تولید گاز به تفکیک ساعت، انرژی قابل متابولیسم و

گوارش پذیری مواد مغذی در شرایط برون تنی

Table 2. Interaction effects of level of concentrate and duration of consumption of fattening diets on gas production, metabolizable energy and organic matter digestibility *in vitro*

Day in fattening period (Time) % of concentrate in diet (Conc)	70 d			100 d			SEM ⁸	P-value		
	55	70	85	55	70	85		Time	Conc	Time×Conc
GP ₁₆ ¹	27.7 ^{bc}	32.5 ^{ab}	36.05 ^a	26.5 ^c	23.8 ^c	34.5 ^a	1.65	0.009	<0.01	0.06
GP ₂₄ ²	33.5 ^{bc}	39.6 ^{ab}	46.5 ^a	32.9 ^c	28.9 ^c	43.2 ^a	1.85	0.017	<0.01	0.016
GP ₄₈ ³	39.6 ^{bc}	45.8 ^{ab}	50.1 ^a	37.6 ^c	32.8 ^c	49.7 ^a	2.43	0.014	<0.01	0.034
GP ₇₂ ⁴	41.4 ^{bc}	48.2 ^{ab}	50.9 ^a	40.7 ^c	35.2 ^c	52.9 ^a	2.81	0.092	0.001	0.031
TGP ⁵	42.3 ^{bc}	49.8 ^{ab}	50.9 ^a	41.0 ^c	35.8 ^c	53.8 ^a	2.98	0.093	0.002	0.025
b ⁶	41.6 ^{bc}	49.9 ^{ab}	51.6 ^a	40.3 ^c	35.0 ^c	52.9 ^a	2.76	0.04	0.007	0.025
c ⁷	0.06	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	0.006	0.091	0.517	0.463
Metabolizable energy (MJ/kg DM)	7.64	8.37	8.97	7.51	7.21	8.76	0.21	<0.01	0.011	0.055
Organic matter digestibility (mg/g.DM)	502	455	576	495	469	563	14	0.001	0.012	0.052

در هر ردیف اعدادی که دارای حروف غیر مشابه هستند اختلاف آماری معنی داری دارند ($P < 0.05$).

۱. حجم گاز تولیدی پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون (میلی لیتر)، ۲. حجم گاز تولیدی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (میلی لیتر)، ۳. حجم گاز تولیدی پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون (میلی لیتر)، ۴. حجم گاز تولیدی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون (میلی لیتر)، ۵. کل حجم گاز تولیدی پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون (میلی لیتر)، ۶. پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی لیتر)، ۷. نرخ تولید گاز (میلی لیتر در ساعت)، ۸. خطای استاندارد میانگین.

Values in each row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

1. *In vitro* gas production (IVGP) for 16 h (ml), 2. IVGP for 24 h (ml), 3. IVGP for 48 h (ml), 4. IVGP for 48 h (ml), 5. Total gas production for 96 h (ml), 6. Gas production from the insoluble but fermentable fractions for 96 h (ml), 7. Rate constant of gas production during incubation (/h), 8. Standard error of the means

جدول ۳. تأثیر درصد کنسانتره و مدت مصرف جیره بر غلظت نیتروزن آمونیاکی، pH، ضریب تفکیک و جمعیت پروتوزوایی

شکمه در شرایط برون تنی

Table 3. Effects of concentrate level and duration of consumption of fattening diets on ammonia nitrogen concentration, pH, dissociation coefficient and rumen protozoan population on *in vitro* gas production parameters

	% of concentrate in diet (Conc)			SEM ¹	Day in fattening period (Time)		SEM ³	P-value		
	55	70	85		70 d	100 d		Time	Conc	Time×Conc
pH	6.02 ^a	5.95 ^b	5.78 ^b	0.04	5.98	5.85	0.03	0.001	0.011	0.787
Total protozoa (×10 ⁴ ml)	16.8 ^b	16.1 ^b	33.3 ^a	2.16	19.8	24.3	1.76	<0.01	0.090	0.933
Dissociation coefficient	3.93	3.5	3.5	0.26	3.62	3.65	0.21	0.41	0.934	0.213

در هر ردیف در بخش سطح کنسانتره جیره اعدادی که دارای حروف غیر مشابه هستند اختلاف آماری معنی داری دارند ($P < 0.05$).

۱. خطای استاندارد میانگین

Values in each row within level of concentrate with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

1. Standard error of the means

جدول ۴. تأثیر سطح کنسانتره و مدت زمان مصرف جیره بر غلظت کل و نسبت اسیدهای چرب فرآر شکمه در شرایط برون تنی

Table 4. Effects of concentrate level and duration of consumption of fattening diet on total concentration and relative ratio of ruminal volatile fatty acids *in vitro*

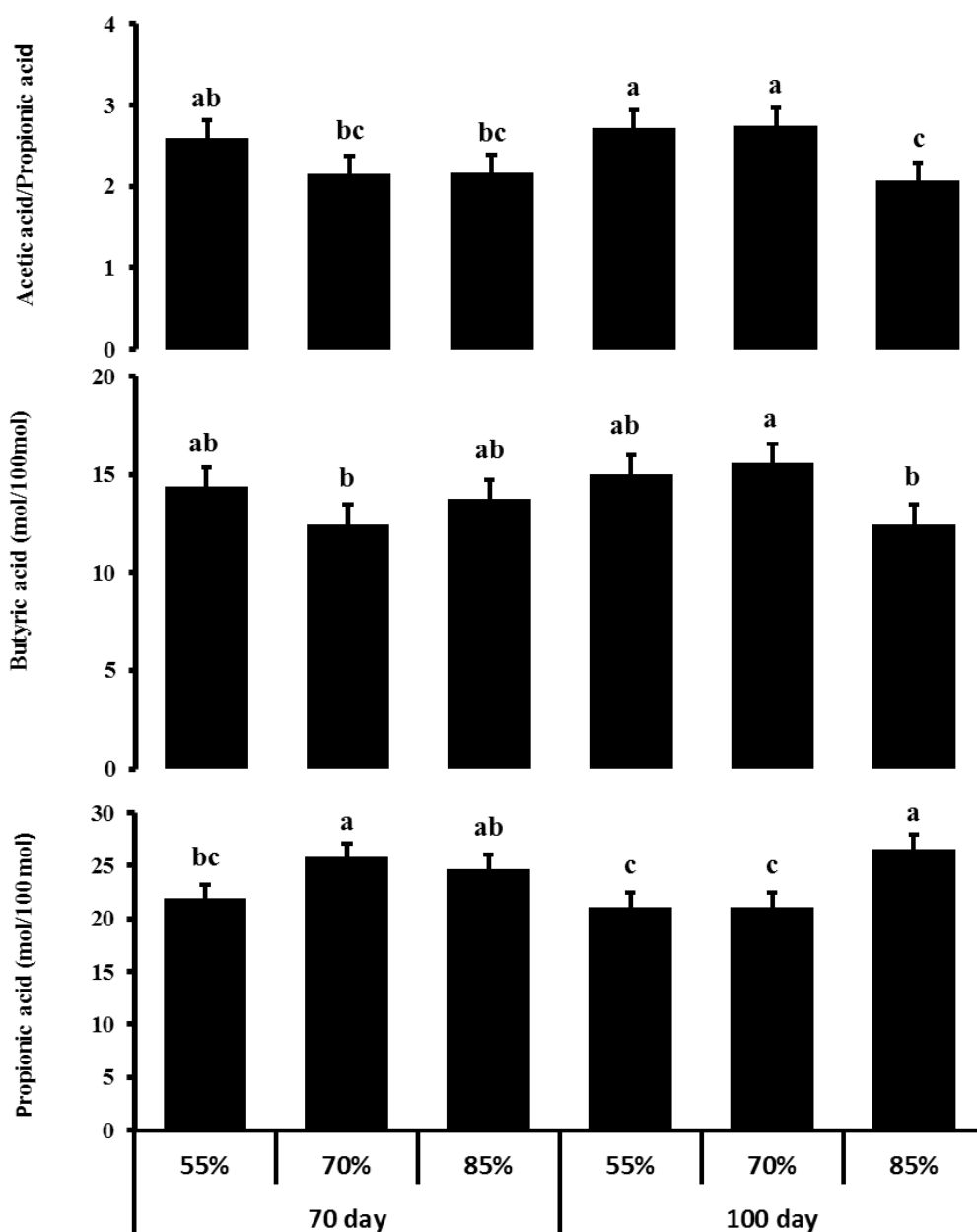
	% of concentrate in diet (Conc)			SEM ¹	Day in fattening period (Time)		SEM ¹	P-value		
	55	70	85		70 d	100 d		Time	Conc	Time×Conc
Acetic acid (mmol/100 mmol)	57.1 ^a	56.3 ^b	54.4 ^b	0.45	55.4	56.6	0.37	<0.01	0.033	0.662
Propanoic acid (mmol/100 mmol)	21.5 ^c	23.4 ^b	25.6 ^a	0.48	24.1	22.9	0.39	<0.01	0.03	<0.01
Butyric acid (mmol/100 mmol)	14.8	14	13.1	1.22	13.5	14.3	0.35	0.058	0.115	<0.01
Isobutyric acid (mmol/100 mmol)	2.15	1.85	2.07	0.18	2.36	1.68	0.15	0.49	<0.01	0.571
Valeric acid (mmol/100 mmol)	2.23 ^{ab}	2.21 ^b	2.51 ^a	0.08	2.44	2.20	0.06	0.035	0.020	0.158
Isovaleric acid (mmol/100 mmol)	2.30	2.15	2.22	0.05	2.16	2.30	0.04	0.185	0.046	0.052
Acetic acid/ Propanoic acid	2.66	2.45	2.13	0.5	2.31	2.51	0.05	<0.01	0.032	0.015

در هر ردیف در بخش سطح کنسانتره جیره، اعدادی که دارای حروف غیر مشابه هستند، اختلاف آماری معنی داری دارند ($P < 0.05$).

۱. خطای استاندارد میانگین

Values in each row within level of concentrate with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

1. Standard error of the mean



شکل ۱. میانگین اثرات متقابل بین مدت مصرف (۷۰ و ۱۰۰ روز) و درصد کنسانتره (۵۵، ۷۰، ۸۵ درصد) جیره پروراری بر غلظت اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک و نسبت اسید استیک: اسید پروپیونیک بعد از ۱۶ ساعت انکوباسیون در شرایط برون تنی. هیستوگرام‌های که دارای حروف غیرمشابه هستند، اختلاف آماری معنی‌داری دارند ($P < 0.05$).

Figure 1. Means of interaction effects between duration of consumption (70 and 100 day) and concentrate level (55, 70, and 85%) of fattening diet on concentration of propionic acid, butyric acid and acetic acid: propionic acid after 16 hours of incubation *in vitro*. Histograms with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

سطح کنسانتره جیره میزان تولید گاز در شرایط برون تنی افزایش یافت. افزایش غلظت نشاسته و همزمان کاهش کربوهیدرات‌های غیرنشاسته‌ای در جیره‌ها می‌تواند دلیل اصلی افزایش تولید گاز در جیره ۸۵ درصد کنسانتره نسبت به جیره ۵۵ درصد کنسانتره

بحث

در پژوهش حاضر با افزایش درصد کنسانتره جیره، میزان گاز تولیدی و به تبع آن پارامترهای مرتبط با تولید گاز افزایش داشت. این نتایج مشابه نتایج گزارش شده توسط Arbabi *et al.* (2014) بود که با افزایش

پركنسانتره، غلظت کمتر استات در جیره‌های پركنسانتره را توجیه می‌کند. جیره‌های با نسبت علوفه کم و کنسانتره زیاد موجب تغییر در الگوی اسیدهای چرب فرآر شکمبه می‌شود. جیره‌های پركنسانتره موجب کاهش نسبت استات و افزایش پروپیونات می‌شوند. بخشی از اسیدپروپیونیک تولیدی به لاکتات تبدیل می‌شود و لذا به دلیل قدرت اسیدی بیشتر اسیدلاکتیک ($pK_a=3/86$) در مقایسه با اسیدپروپیونیک ($pK_a=4/87$)، pH محتویات شکمبه به سمت اسیدی شدن سوق پیدا می‌کند. با این وجود مشخص شده است که pH شکمبه به خودی خود و بدون توجه به نوع جیره می‌تواند بر الگوی اسیدهای چرب فرآر در شکمبه تأثیر بگذارد. در واقع تغییرات در غلظت کل اسیدهای چرب فرآر و غلظت اسیدپروپیونیک نه تنها وابسته به درصد کنسانتره جیره بلکه تحت تأثیر pH نیز تغییر می‌کند (Calsamiglia *et al.*, 2008). غلظت اسیدپروپیونیک در جیره‌های پركنسانتره با کاهش pH افزایش یافت (Calsamiglia *et al.*, 2008). در پژوهش‌های دیگر نیز ارتباط معنی‌داری بین pH و پروفیل اسیدهای چرب فرآر تشکیل‌شده در شکمبه گزارش شده است (Dijkstra *et al.*, 2012). اسیدی شدن محیط شکمبه در جیره‌های پركنسانتره معمولاً بر میکروفلورای شکمبه تأثیر دارد و سبب کاهش فعالیت باکتری‌های سلولولایتیک می‌شود (Gudla *et al.*, 2012). تغییرات در قابلیت هضم و تخمیر میکروبی به اسیدیته و نسبت کنسانتره جیره مرتبط است، در حالی که تغییرات در گوارش‌پذیری فیبر و ماده‌آلی، غلظت اسیداستیک و اسیدبوتیرات تنها وابسته به pH است (Dijkstra *et al.*, 2012).

غلظت نیتروژن آمونیاکی در جیره ۸۵ درصد کنسانتره نسبت به دو جیره دیگر به طور قابل توجهی افزایش یافت. غلظت نیتروژن آمونیاکی وابسته به سطح کنسانتره و درصد پروتئین جیره است (Calsamiglia, 2008). در جیره‌های پر کنسانتره؛ کاهش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده فیبر همراه با افزایش جمعیت پروتوزوا رخ می‌دهد (Zang, 2017). در پژوهش حاضر، جمعیت پروتوزوا در جیره ۸۵ درصد کنسانتره نسبت به جیره‌های ۵۵ و ۷۰ درصد کنسانتره

باشد. گاز تولیدی در شرایط برون‌تنی شامل دی‌اکسیدکربن و متان است که به طور مستقیم از تخمیر میکروبی و به‌صورت غیر مستقیم از واکنش بین اسیدهای چرب فرآر با بی‌کربنات حاصل می‌شود (Beuvink & Spoelstra, 1992). لذا مقدار گاز تولیدی با توده مواد هضم‌شده ارتباط مستقیمی دارد (Menke & Steingass, 1998). تولید گاز با تولید خالص اسیدهای چرب فرآر و سنتز میکروبی نیز رابطه خطی دارد (Krishnamurty *et al.*, 1991). با این وجود، وقتی که مدت مصرف جیره‌ها از ۷۰ روز به ۱۰۰ روز افزایش یافت، حجم گاز تولیدی ساعت ۲۴ در جیره ۷۰ درصد کنسانتره کاهش یافت.

در پژوهش حاضر، pH محتویات ویال‌های حاوی مایع شکمبه بعد از ۱۶ ساعت با افزایش درصد کنسانتره کاهش یافت. لازم به ذکر است که نتایج مربوط به فراسنجه‌های شکمبه‌ای که در این مقاله ارائه شده است مربوط به آنالیز محتویات ویال‌های حاوی مایع شکمبه بعد از ۱۶ ساعت انکوباسیون است. از دلایل کاهش pH در جیره حاوی ۸۵ درصد کنسانتره می‌توان به افزایش نسبت کربوهیدرات‌های غیرفیبری جیره اشاره نمود. تجزیه باکتریایی کربوهیدرات‌های محلول سبب افزایش تولید اسیدهای چرب فرآر می‌شود که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی داشت. میزان تولید اسیدهای چرب فرآر در جیره‌های حاوی ۷۰ و ۸۵ درصد کنسانتره در مقایسه با جیره دارای ۵۵ درصد حدود ۲۰ درصد بیشتر بود. نتایج مشابهی توسط سایر محققین گزارش شده است (Carro *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). اخیراً (Zang *et al.*, 2017) گزارش کردند که نسبت اسیدبوتیریک با افزایش کنسانتره جیره به‌صورت خطی افزایش یافت. هنگامی که تولید اسیدهای چرب فرآر افزایش یابد، توانایی پرزهای شکمبه در جذب اسیدهای چرب فرآر شکمبه کاهش یافته و در نتیجه pH شکمبه کاهش می‌یابد (Dijkstra *et al.*, 2012). در آزمایش حاضر، افزایش غلظت اسیدهای چرب فرآر بیشتر مربوط به افزایش در میزان اسیدپروپیونیک تولیدی بود که با افزایش درصد کنسانتره جیره غلظت آن افزایش خطی داشت. از طرفی مصرف کمتر الیاف نامحلول در شوینده‌خنی در جیره‌های

مقابل غلظت اسیداستیک و اسیدایزو والریک افزایش یافت. افزایش نسبت اسیداستیک به اسیدپروپیونیک می تواند نشان دهنده فعال شدن دوباره باکتری های سلولولیتیک و یا کاهش فعالیت باکتری های آمیلولیتیک باشد. کاهش pH در شکمبه سبب تأثیر منفی بر رشد باکتری های فیبرولایتیک و به تبع آن کاهش هضم موادمغذی در شکمبه می شود (Wanapat *et al.*, 2013). در آزمایش حاضر با طولانی تر شدن مدت مصرف جیره ها از ۷۰ به ۱۰۰ روز تغییراتی در تولید گاز، غلظت نیتروژن آمونیاکی و غلظت اسیدهای چرب فرآر رخ داد. این تغییرات در کاهش گوارش پذیری ماده آلی منعکس شد. در پژوهش های دیگر گزارش شده است که مصرف جیره های پرکنسانتره تحرک شکمبه (Nocek, 1997; Owens *et al.*, 1998) را کاهش و سبب کراتینه شدن پرزهای شکمبه (Nocek & Kesler, 1980; Zitnan *et al.*, 2003) و نهایتاً کاهش جذب اسیدهای چرب فرآر (Hinders & Owen, 1965) شده است. همچنین مشخص شده است که افزایش سطح کنسانتره جیره دام های نشخوارکننده غلظت موادی از قبیل اندوتوکسین ها و هیستامین را افزایش می دهد (Mao *et al.*, 2016). در آزمایشات مزرعه ای (اینویو)، عملکرد و ضرایب قابلیت هضم موادمغذی در بره های پرواری (افزایش ضریب تبدیل غذایی) دریافت کننده جیره پرکنسانتره (بالای ۸۰ درصد جیره) در انتهای دوره پروار در مقایسه با اوایل دوره پروار کاهش یافت (Asadi *et al.*, 2016). افزایش نسبت کنسانتره به علوفه جیره بر میزان هضم شکمبه ای تأثیر منفی داشت (Gudla *et al.*, 2012). لذا به نظر می رسد که هر چند افزایش سطح کنسانتره جیره ممکن است سبب بهبود عملکرد دام های پرواری شود، در عین حال مصرف جیره های پرکنسانتره به مدت طولانی ممکن است اثرات منفی بر توان هضمی دام ها داشته باشد، که این نکته هم از لحاظ سلامت دام و هم از نظر اقتصادی حائز اهمیت است.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که هر دو عامل درصد

حدود دو برابر افزایش داشت. Mao *et al.* (2016) نشان دادند که افزایش سطح غلات در جیره تعداد پروتوزوای شکمبه را افزایش می دهد. افزایش سطح کنسانتره فراوانی نسبی باکتری های سلولولایتیک را کاهش داده و در مقابل فراوانی نسبی باکتری های تجزیه کننده کربوهیدرات های غیرفیبری را افزایش می دهد (Zang, 2017). عامل دیگر در ایجاد تغییرات در جمعیت پروتوزوای شکمبه، اسیدیته محیط است. جمعیت پروتوزوا با افزایش اسیدیته شکمبه کاهش می یابد، بعضاً این کاهش موقتی است و مجدداً با فراهم شدن شرایط مناسب تعداد پروتوزوا سریعاً افزایش می یابد (Stewart, 1997). با این وجود، در پژوهش حاضر برعکس این مشاهده شد یعنی جمعیت پروتوزوا در جیره حاوی کنسانتره بالا (۸۵ درصد) افزایش یافت که نیاز به تحقیقات تکمیلی دارد.

غلظت نیتروژن آمونیاکی در ویال هایی که از مایع شکمبه ۱۰۰ روز پروار در آنها استفاده شده بود، در مقایسه با آن هایی که از مایع شکمبه ۷۰ روزه استفاده شده بود، کمتر بود. معمولاً غلظت نیتروژن آمونیاکی محتویات شکمبه به عنوان شاخصی برای سنجش میزان سنتر پروتئین میکروبی استفاده می شود (Chamberlain *et al.*, 1993). نیتروژن آمونیاکی یک منبع نیتروژن برای باکتری های فیبروباکتر است که در جیره های علوفه ای در محیط شکمبه غالب هستند. لذا افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی می تواند نشان دهنده کاهش تدریجی باکتری های سلولیتیک در جیره های پرکنسانتره باشد (Zang, 2017).

در آزمایش حاضر، طولانی تر شدن مدت مصرف جیره ها سبب کاهش pH محتویات ویال ها و تغییرات قابل توجهی در غلظت اسیدهای چرب فرآر شد. کاهش گاز تولیدی در دوره ۱۰۰ روزه نسبت به ۷۰ روزه می تواند ناشی از کاهش pH شکمبه و تغییر در جمعیت باکتریایی شکمبه باشد. جمعیت میکروبی شکمبه تحت تأثیر pH شکمبه تغییر می کند و با کاهش pH شکمبه تخمیر و تولید اسیدهای چرب فرآر کاهش می یابد (Krishnamurty *et al.*, 1991). با طولانی تر شدن دوره مصرف جیره ها، غلظت اسیدپروپیونیک و اسیدایزوبوتیریک کاهش یافته و در

گوارش پذیری مواد مغذی داشت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کوتاه تر نمودن طول دوره پرورار در هنگام استفاده از جیره های پرکنسانتره می تواند به بهینه نمودن شرایط تخمیر در شکمبه بره های پروراری کمک کند.

کنسانتره جیره و مدت مصرف جیره پرکنسانتره بر میزان تولید گاز، فراسنجه های تخمیر، جمعیت پروتوزوای شکمبه، نیتروژن آمونیاکی و غلظت اسیدهای چرب فرار در شرایط برون تنی تأثیرگذار است. علی رغم اینکه افزایش درصد کنسانتره تا ۸۵ درصد ماده خشک جیره سبب بهبود فراسنجه های تولید گاز و تخمیر و گوارش پذیری مواد مغذی شد ولی طولانی تر شدن مدت مصرف اثرات منفی بر فراسنجه های تخمیر و

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه لرستان به خاطر تأمین مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد.

REFERENCES

1. AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
2. Arbabi, S., Ghoorchi, T., Ramezani, S. S. & Torbatinejad, N. (2014). *Effects of forage to concentrate ratios based on faba bean on fermentation, cellulase enzyme activity, and population of bacteria in rumen sheep*. Ph.D. Thesis Faculty of Animal Nutrition, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.
3. Asadi, A., Kiani, A., Azarfar, A. & Valipour, A. (2016). Effects of Metafix with or without Monensin on performance and blood metabolites in Farahani lambs. *Iranian Journal of Animal Science*, 47, 421-428. (in Farsi)
4. Beuving, J. M. V. & Spoelstra, S. F. (1992). Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering system and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37 (4), 505-509.
5. Blümmel, M., Karsli, A. & Russell J. R. (2003). Influence of diet on growth yields of rumen microorganisms *in vitro* and *in vivo*: Influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *British Journal of Nutrition*, 90, 625-634.
6. Blümmel, M., Steingass, H. & Becker, K. (1997). The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and ¹⁵N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77, 911-921.
7. Broderick, G. & 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.
8. Carro, M. D., Valdés, C., Ranilla, M.J. & González, J.S. (2000). Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep. *Journal of Animal Science*, 70, 127-134.
9. Chamberlain, D. G. Robertson, S. & Choung, J. J. (1993). Sugars versus starch as supplements to grass silage: effects on ruminal fermentation and the supply of microbial protein to the small intestine, estimated from the urinary excretion of purine derivatives in sheep. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 63, 189-194.
10. Calsamiglia, S., Cardozo, P.W., Ferret, A. & Bach, A. (2008). Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *Journal of Animal Science*, 86, 702-711.
11. Dehority, B. A. (2003). *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press. Nottingham, U.K.
12. Dijkstra, J., Ellis, J. L., Kebreab, E., Strathe, A. B., Lopez, S., France, J. & Bannink, A. (2012). Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 22-33.
13. Gudla, P., AbuGhazaleh, A. A., Ishlak, A. & Jones, K. (2012). The effect of level of forage and oil supplement on biohydrogenation intermediates and bacteria in continuous cultures. *Animal Feed Science and Technology*, 171, 108-116.
14. Hinders, R. G. & Owen, F. G. (1965). Relation of ruminal parakeratosis development to volatile fatty acid absorption. *Journal of Dairy Science*, 48, 1069-1078.
15. Krishnamurthy, U., Steingass, U. & Menke, K. H. (1991). Preliminary observations on the relationship between gas production and microbial synthesis *in vitro*. *Archive of Animal Nutrition*, 41(5), 521-526.
16. Marten, G. C. & Barnes, R. F. (1980). Prediction of energy digestibility of forages within *in vitro* rumen fermentation and fungal enzymes systems. In: Pidgen, W. J., Balch, C. C. & Graham, M. (Eds), *Standardization of Analytical Methodology for Feeds*. (pp 61-71.) International Development Research Center, Ottawa.
17. 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 and Development*, 28, 7-55.

18. Mao, S. Y., Huo, W. J. & Zhu, W. Y. (2016). Microbiome-metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota with increasing dietary grain in a goat model. *Environmental Microbiology*, 18, 525-541.
19. Nocek, J. E. (1997). Bovine acidosis: Implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*, 80, 1005-1028.
20. Nocek, J. E. & Kesler, E. M. (1980). Growth and rumen characteristics of Holstein steers fed pelleted or conventional diets. *Journal of Dairy Science*, 63, 249-254.
21. NRC. (2007). *Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. Washington (DC, USA): National Academy of Sciences.
22. Norollahi, H. (2007). Effect of fattening period on growth and carcass characteristics of male Turkey-Ghashghaii lambs. *Journal of Pajohesh and Sazandegi*, 75, 132-137.
23. Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J. & Gill, D. R. (1998). Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 76, 275-286.
24. Papi, N. & Mostafa Tehrani, A. (2017). Effects of dietary concentrate levels on growth performance, feed intake and carcass characteristics of fattening shall male lambs. *Journal of Ruminant Research*, 5(2). (in Farsi)
25. Stewart, C. S. (1977). Factors affecting the cellulolytic of rumen contents. *Applied Environmental Microbiology*, 33, 497-503.
26. Sun, Y. Z., Mao, S. Y. & Zhu, W. Y. (2010). Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. *Animal*, 4, 210-217.
27. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
28. Wanapat, M., Gunun, P., Anantasook, N. & Kang, S. (2013). Changes of rumen pH, fermentation and microbial population as influenced by different ratios of roughage (rice straw) to concentrate in dairy steers. *The Journal of Agricultural Science*, 152, 675-685.
29. Wang, Y. H., Xua, M., Wang, F. N., Yz, Z. P., Yao, J. H., Zan, L. S. & Yang, F. X. (2009). Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats. *Livestock Science*, 122, 48-52.
30. Zang, J., Shi, H., Wang, Y., Li, S., Cao, Z., Ji, S., He, Y. & Zang, H. (2017). Effect of dietary forage to concentrate ratios on dynamic profile changes and interactions of ruminal microbiota and metabolites in Holstein heifers. *Frontiers in Microbiology*, 8. Doi: 10.3389/fmicb.2017.02206.
31. Zitnan, R., Kuhla, S., Nurnberg, K., Schonhusen, U., Ceresankova, Z. & Sommer, A. (2003). Influence of the diet on the morphology of ruminal and intestinal mucosa and on intestinal carbohydrate levels in cattle. *Veterinary Medicine-Czech*, 48, 177-182.