Iranian Journal of Animal Science
Vol 52, No 1, Spring 2021 (37-49)
DOI: 10.22059/ijas.2021.295469.653765

علوم دامی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۱، بهار ۱۴۰۰ (ص ۴۹-۳۷)

ارزیابی کارایی پرتوتابی مایکروویو و افزودنی‌های جاذب سموم بر دیازینون باقی‌مانده در تفاله انگور سفید و تأثیر آن بر برخی فراسنجه‌های شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی

بهزاد پورمحمود[۱]، حامد خلیل وندی بهروزیار[۲*] و رسول پیرمحمدی[۳]
۱، ۲ و ۳. دانش‌آموخته دکتری تغذیه دام، استادیار و استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۶)

چکیده

هدف این پژوهش بررسی اثر پرتو تابی مایکروویو و جاذب‌های مختلف سموم بر میزان دیازینون باقی‌مانده در تفاله انگور سفید و تأثیرگذاری این فرآوری‌ها بر برخی فراسنجه‌های شکمبه و تولید گاز در شرایط برون‌تنی بود. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- تفاله انگور سفید بدون فرآوری یا گروه شاهد، ۲- تفاله انگور فرآوری شده با پرتو تابی مایکروویو، ۳- تفاله انگور فرآوری شده با جاذب سموم مایکوفیکس پلاس (Mycofix-plus)، ٤- تفاله انگور فرآوری شده با جاذب سموم بیوتوکس (Bio-Tox) و ٥- تفاله انگور فرآوری‌شده با اسیدیفایر بیواسید (Bio-Acid) بود. نتایج این آزمایش نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار (P< ۰/۰۵) مقدار ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی در تیمار حاوی فرآوری با پرتو تابی مایکروویو بود. فرآوری‌های مختلف سبب کاهش (P< ۰/۰۵) مقادیر سم دیازینون در تفاله انگور سفید شد، به‌طوری‌که بیشترین سم دیازینون در تیمار شاهد (۳/۸٦ mg/kg) و کمترین مقدار سم در تیمار فرآوری شده با مکمل Bio-Tox برابر با (۰/۵۷ mg/kg) مشاهده شد. مقادیر گاز تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون، غلظت کل اسیدهای چرب فرار و پروپیونات شکمبه، قابلیت هضم ماده خشک و میزان متان تولیدی درنتیجه فرآوری‌های مختلف افزایش یافت (P< ۰/۰۵). فرآوری‌های مختلف میزان استات را کاهش و درعین‌حال تأثیر معنی‌داری (P>۰/۰۵) بر جمعیت تک‌یاخته‌ای شکمبه نداشت. افزودن جاذب‌های مختلف سبب افزایش (P<۰/۰۵) میزان بوتیرات و ایزوبوتیرات شد. به‌طورکلی، پرتو تابی مایکروویو و جاذب‌های مختلف مقادیر سم دیازینون در تفاله انگور سفید را کاهش داد و سبب بهبود برخی فراسنجه‌های شکمبه در شرایط برون‌تنی شد.

واژه‌های کلیدی: پرتوتابی مایکروویو، تفاله انگور، تولید گاز، جاذب سموم، دیازینون.

Evaluation of microwave irradiation and toxin adsorbents on Diazinon residues in white grape pomace and its effect on some ruminal parameters *in vitro* condition

Behzad PourMahmoud[1], Hamed Khalilvandi-Behroozyar[2*] and Rasoul Pirmohammadi[3]
1, 2, 3. Former Ph.D. Student of Animal Nutrition, Assistant Professor and Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
(Received: Jan. 7, 2020 - Accepted: Feb. 14, 2021)

ABSTRACT

The aim of this research was to determine effects of microwave irradiation and different toxin adsorbents on the amount of Diazinon residues in white grape pomace and effectiveness of these processes on some rumen parameters and gas production *in vitro* condition. This study, were investigated in a completely randomized design with 5 treatments and 5 replications. Experimental treatments included: 1- White grape pomace without processed or control group 2- Grape pomace processed with microwave irradiation 3- Grape pomace processed with Mycofix-Plus toxin adsorbent 4- Grape pomace processed with Bio-Tox toxin adsorbent 5- Grape pomace processed with Bio-Acid toxin adsorbent. The results of this study showed a significant increase in the amount of dry matter, neutral detergent fiber and acid detergent fiber in the microwave treatment (P<0.05). Different processes reduced the amount of Diazinon in the white grape pomace (P<0.05), so the highest amount of Diazinon in control treatment (3.86 mg/kg) and the lowest amount of toxin was observed in treatment group treated with Bio-Tox supplement (0.57 mg/kg). Different processes increased in vitro gas production, total VFA, propionic acid concentration, dry matter digestibility and Methane (P<0.05). Different processes reduced acetate concentration and did not have a significant effect on the Rumen protozoa population (P>0.05). Adding different adsorbents increased butyrate and isobutyrate concentration (p<0.05). As a conclusion, microwave irradiation and different toxin adsorbents reduced the amount of Diazinon in the white grape pomace and improved some ruminal parameters in vitro condition.

Keywords: Diazinon, gas production, grape pomace, microwave irradiation, toxins adsorbent.

* Corresponding author E-mail: h.khalilvandi@urmia.ac.ir

مقدمه

استفاده بهینه از منابع خوراک غیرمتداول و غیرمتعارف که با غذاهای انسان رقابت نمی‌کنند، جهت تأمین خوراک دام ضروری است (Aghajanzadeh Golshani *et al*., 2010). بسیاری از این خوراک‌ها پتانسیل و ارزش اساسی به‌عنوان خوراک دام دارند و استفاده از این فرآورده‌های فرعی ممکن است به لحاظ اقتصادی ارزشمند و به‌صرفه باشند، درحالی‌که خوراک‌های عمومی اغلب گران‌قیمت هستند (Khatooni *et al*., 2014). تفاله انگور یکی از فرآورده‌های فرعی کارخانه‌های صنایع تبدیلی (آب‌میوه‌گیری) در کشور است که حاوی نسبت‌های متغیری از پوسته، تفاله و دانه انگور است (Baumgartel *et al*., 2007). براساس آمارنامه کشاورزی (۱۳۹۲) کشور ایران با تولید حدود ۳ میلیون تن انگور در سال، دارای رتبه ششم جهانی در تولید انگور است. با توجه به تولید ۳ میلیون تنی انگور در کشور، میزان تولید تفاله انگور در سال بالغبر ۵۰۰۰۰ تن است (Abarghuei *et al*, 2010). تفاله انگور حاوی مقدار زیادی متابولیت‌های ثانویه مانند تانن، ساپونین و آلکالوئیدها و ترکیبات فنولیک است که دارای خاصیت میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب و تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی است (Abarghuei *et al*., 2010). تفاله انگور به سبب داشتن ترکیبات (فنولیک و ساپونین) باعث بهبود تخمیر شکمبه در گوسفند و بز در شرایط برون‌تنی می‌شود (Abarghuei & Rouzbehan, 2013).

کاربرد آفت‌کش‌ها همواره بخشی از عملیات داشت در کشاورزی و باغبانی می‌باشد. سالانه بیش از ۲ میلیون تن سموم دفع آفات نباتی در دنیا مصرف می‌شود. در ایران میزان خرید این سموم سالیانه حدود ۲۴۰۰۰ تن برآورد شده است (Hadian *et al*., 2006). هر ماده سمی در میوه‌ها، که پس از به‌کاربردن آفت‌کش‌ها در آن‌ها باقی‌مانده باشد، به عنوان بقایای آفت‌کش ها شناخته می‌شود. این اصطلاح، هرگونه مشتقات یک آفت‌کش مانند متابولیت‌ها، مواد خاص حاصل از تجزیه آفت‌کش‌ها، ترکیبات ناشی از واکنش آفت‌کش‌ها و ناخالصی‌هایی که سمی باشند را شامل می‌شود (Iranian National Standard Organization, 2013). سموم شیمیایی از منظر مکانیسم اثر به چند دسته تقسیم می‌شوند: سموم گوارشی، سموم تماسی، سموم تنفسی، سموم فاسد کننده و سموم سیستماتیک؛ که دو دسته مهم آن‌ها عبارت‌اند از: سموم سیستماتیک و سموم نفوذی که در صورت استفاده از این دو دسته در محصولات جالیزی و میوه‌ها، در صورت عدم رعایت دوره ماندگاری سم، به هیچ عنوان با شستن، حرارت دادن و فریز کردن، باقی‌مانده سموم از بین نمی‌رود و در فرآورده‌های کشاورزی و میوه‌ها باقی می‌ماند (Karami *et al*., 2019). ازاین‌رو، همواره توصیه می‌شودکه استفاده از سموم شیمیایی به‌عنوان آخرین راهکار مبارزه مورد استفاده قرار گیرد.

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره، دسته‌ای از مواد شیمیایی فسفردار است که برای کنترل طیف وسیعی از آفات در بخش کشاورزی استفاده شده و در حال حاضر کاربرد این سموم در جهان رو به گسترش است (Gaikward *et al*., 2015). استفاده بیش‌ازحد سموم ارگانوفسفره و عدم رعایت دوره ماندگاری موجب ایجاد بقایای سموم در فرآورده‌ها، آب، خاک و جو زمین می‌شود. ((Schipper *et al*., 2008 ارگانوفسفره‌ها عوامل آلکیله‌کننده هستند که با ماکرو مولکول‌های سلول مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها واکنش داده و باعث تغییر عملکرد آن‌ها می‌شوند (Fattahi, 2017). دیازینون یک آفت‌کش از دسته ارگانوفسـفره‌ها است و با وجود اینکه بسیاری از اثرات مخرب آن به اثبات رسیده، اما توسط بسیاری از کشاورزان ایرانی علیه طیف وسیعی از آفات به‌ویژه کرم خوشه‌خوار انگور در تاکستان‌ها استفاده می‌شود. گزارش‌شده است که نیمه‌عمر بیولوژیکی دیازینون در بدن پستانداران ۱۲ ساعت است، ولی ممکن است تا ۲ هفته نیز آثار این آفت‌کش در بدن مشاهده گردد (Debski *et al*., 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهد که سمیت دیازینون به علت بازدارندگی آنزیم استیل کولین استراز موجود در سیستم عصبی موجود زنده است (Baratian Ghorghi *et al*., 2014). برخی از محققین بر این باورند که دیازینون با ایجاد

رادیکال‌های آزاد و اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، تنش اکسیداتیو را القا کرده و با افزایش پراکسیداسیون لیپیدها موجب القای مرگ سلولی در موجودات می‌شود (Sargazi *et al*., 2016). امروزه به‌کارگیری فناوری‌های نوین و بهره‌مندی از فرآورده‌های سودمند با افزایش و توازن جمعیت میکروبی سودمند دستگاه گوارش، باعث بهبود و جذب مواد غذایی در دام‌ها شده است. علاوه بر این، فناوری‌های نوین باعث تندرستی، رشد و تولید بهتر، بیشتر و اقتصادی‌تر نسبت به راه‌کارهای طبیعی و آلی می‌شوند.

در سال‌های اخیر فرآیند پرتو تابی به‌عنوان عمل‌آوری پاک مطرح است و آلودگی شیمیایی ایجادشده در فرآوری‌های فیزیکی و شیمیایی را ندارد. به‌علاوه این عمل‌آوری دارای کارایی بالایی نسبت به سایر روش‌های عمل‌آوری است و می‌تواند جایگزین مناسبی برای سایر عمل‌آوری‌های مرسوم دیگر باشد (Asadnejad *et al*., 2018). در بررسی کارایی فرآوری پرتو تابی مایکروویو در کاهش باقی‌مانده سم دیازینون، کاهش معنی‌دار این سم گزارش‌شده است (Golghasem, 2017). گزارش‌شده است که فرآوری مایکروویو به دلیل تأثیر بر دیواره سلولی تفاله انگور سفید موجب بهبود فراسنجه‌های شکمبه‌ای می‌گردد (Asadnejad, 2015). برای کاهش و یا حذف بقایای سموم سه روش وجود دارد: نخست، استفاده از مواد جاذب و یا باند کننده که بتواند سم واردشده به شکمبه و روده را جذب و از انتشار آن در بدن جلوگیری نماید. دوم، روش‌های شیمیایی که بدن را تحریک می‌کند تا با سرعت بیشتری سم را متابولیزه و دفع نماید. روش سوم استفاده از ترکیبات فیزیولوژیک جهت خنثی‌سازی اثر سم است (Aazami *et al*., 2017). با توجه به اینکه یکی از هدف‌های مهم متخصصان تغذیهٔ دام افزون بر تأمین نیازهای غذایی نشخوارکنندگان بهبود وضعیت تخمیر در شکمبهٔ آن‌ها است، تحقیقات اخیر نشان داده که بهترین و درعین‌حال باصرفه‌ترین شیوه کاهش بروز اختلالات مربوط به سموم دفع آفات و یا جلوگیری از انتقال این سموم به شیر و سایر فرآورده‌های دامی، استفاده از مواد جاذب، بازدارنده یا مواد باند کننده است (Pourmahmoud *et al*., 2019a; Azami *et al*., 2017; Kazemi *et al*., 2017). امروزه از این جاذب‌ها، افزون بر استفاده در تغذیهٔ انسان، در تغذیهٔ حیوانات مختلف هم به‌عنوان عامل محافظت‌کننده حیوان در برابر بیماری‌ها، تحریک‌کننده رشد، اصلاح‌کننده تخمیر شکمبهٔ نشخوارکنندگان و بهبود تولید حیوانات استفاده می‌شود (Rezaee, 2008;Pourmahmoud *et al*., 2019b). گزارش‌شده است که جاذب‌ها از طریق محافظت زیستی اثر خود را اعمال می‌کنند (Kazemi, 2011). درنهایت جاذب‌های مختلف سموم از طریق جذب سم در روده منجر به دفع کمپلکس چسبان سم در مدفوع انسان و دام می‌شوند (Azami *et al*., 2017). با توجه به کمیاب بودن اطلاعات درزمینهٔ کارایی فرآوری‌ها و جاذب‌های مختلف سموم، هدف این پژوهش ارزیابی کارایی پرتو تابی مایکروویو و افزودنی‌های جاذب سموم بر دیازینون باقی‌مانده در تفاله انگور و تأثیر آن بر برخی فراسنجه‌های شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۵ تکرار در شرایط برون‌تنی انجام شد. مایع شکمبه از سه رأس گوساله نر اخته بالغ هلشتاین مجهز به فیستولای شکمبه‌ای جمع‌آوری شد. کلیه حیوانات مورداستفاده در این آزمایش بر اساس راهنمای نگهداری و استفاده از حیوانات مزرعه‌ای در تحقیقات علوم دامی[1] (۲۰۱۰) نگهداری شد. حیوانات به‌صورت انفرادی، دو بار در روز و با جیره دارای علوفه و کنسانتره تغذیه‌شده و در تمام طول مدت آزمایش به آب آشامیدنی سالم و مکمل مواد معدنی لیسیدنی دسترسی داشتند. تفاله انگور سفید مورد استفاده در این آزمایش به‌صورت تر پس از تهیه از کارخانه پاکدیس ارومیه تا زمان انجام آزمایش‌ها و بررسی دیازینون باقی‌مانده به‌صورت کامل فشرده و در شرایط بی‌هوازی به‌صورت سیلو شده

1. Federation of Animal Science Societies

نگهداری شد. جاذب‌ها و اسیدیفایر مصرفی در این آزمایش شامل الف) جاذب مایکوفیکس پلاس از ۵ ترکیب حاوی: مخلوط سینرژیستی مواد معدنی، ترکیبات بیولوژیک، باکتری BBSH۷۹۷، ترکیبات فایتوژنیک و ترکیبات فایکوفایتیک؛ ب) جاذب بیوتوکس با بهره‌مندی از سیلیکات‌ها و عصاره دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویسیه؛ ج) اسیدیفایر مورداستفاده حاوی اسید فرمیک، اسید پروپیونیک و اسیدلاکتیک و نمک‌های آمونیوم فرمات و آمونیوم پروپیونات بود. جاذب‌ها و اسیدیفایر مورداستفاده در این تحقیق از شرکت بایومین (*Biomin*) آلمان تهیه شد. در تیمار ۱ یا گروه شاهد از تفاله انگور بدون فرآوری و افزودن جاذب‌های تجاری استفاده گردید. در تیمار ۲ تفاله انگور با استفاده از ریزموج (با قدرت ۹۰۰ وات و فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز به مدت ۱۰ دقیقه) پرتو تابی شد. سپس در حین پرتو تابی به‌منظور اطمینان از یکنواختی نمونه‌ها، هر دقیقه یک‌بار درب مایکروویو باز و نمونه‌ها هم زده شد. در تیمارهای ۳، ۴ و ۵ به ترتیب از ۱ گرم جاذب مایکوفیکس پلاس (Mycofix-Plus)، بیوتوکس (Bio-Tox) و اسیدیفایر بیواسید (Bio-Acid) به‌ازای هر کیلوگرم تفاله انگور استفاده شد. کلیه اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی با پنج تکرار انجام گرفت. نمونه‌ها به‌منظور تعیین ترکیب شیمیایی با آسیاب آزمایشگاهی و الک ۱ میلی‌متری آسیاب و ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام و عصاره اتری با استفاده از روش‌های استاندارد (AOAC, 2000) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی(NDF) و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی(ADF) با استفاده از آلفا آمیلاز و تصحیح بر اساس میزان خاکستر آن اندازه‌گیری شد (Vnsoest *et al*, 1991).

شناسایی و اندازه‌گیری باقی‌مانده سم دیازینون به کمک دستگاه HPLC با ۵ تکرار در آزمایشگاه جامع جهاد دانشگاهی آذربایجان غربی انجام گرفت. برای آماده‌سازی نمونه‌های آزمایشی، ابتدا ۵ گرم نمونه را توزین نموده و ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل به‌عنوان حلال استخراج‌کننده به آن اضافه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک برای اسیدی کردن محیط به آن اضافه گردید. به مدت سه دقیقه با اولتراسوند مخلوط کاملاً هم زده شد و درنهایت به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰×g آن را سانتریفوژ کرده از پالایه (۴۵ میکرومتری) گذرانده و به دستگاه HPLC مدل (Agilent 1100) تزریق شد (Cengiz *et al*., 2006).

شرایط دستگاه HPLC

ستون دستگاه C_{18} (۲۵ سانتی‌متری)، فاز متحرک: ایزوکراتیک شامل مخلوط حلالهای استونیتریل: بافر فسفات (pH=۳، ۵۰ میلی مولار) با نسبت (۲۰:۸۰)، طول‌موج جذب ۲۳۰ نانومتر، نوع دتکتور DAD (Direct Array Detector)، فلوی فاز متحرک: یک میلی‌لیتر بر دقیقه می باشند.

به‌منظور تعیین اثر فرآوری با مایکروویو و جاذب‌های مختلف سموم بر میزان گاز تولیدی متراکم در شرایط آزمایشگاهی از تعیین فشار گاز تولیدی (Theodorou *et al*., 1994) در سه دور مجزا و پنج تکرار به ازای هر نمونه در هر دور، استفاده شد (Menke & Steingass., 1988). مایع شکمبه موردنیاز قبل از وعده‌غذایی صبح از شکمبه ۳ رأس گاو نر بالغ اخته فیستوله‌گذاری شده نژاد هلشتاین جمع‌آوری و در فلاسک محتوی گازکربنیک سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. به‌منظور کسب اطمینان از حضور تمامی میکروارگانیسم‌های شکمبه محتویات مایع شکمبه هر سه گاو باهم مخلوط شده و با استفاده از هم‌زن با سرعت بالا به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شده و درنهایت با استفاده از پارچه کتان ۴ لایه صاف شد. پس از صاف کردن، مایع شکمبه و بافر (محلول‌های ماکرومینرال، میکرومینرال، احیاکننده، بافر و ریسازورین) مطابق روش Menke *et al*. (1979) و روش تصحیح‌شده Menke & Steingass (1988) به نسبت یک به دو مایع شکمبه و بافر به داخل بالن سه دهانه مخصوص تحت جریان مداوم دی‌اکسید کربن ریخته شده و تا زمان انتقال به شیشه‌های حاوی نمونه در حمام آبی با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Menke & Steingass, 1988; Menke *et al*., 1979). برای اندازه‌گیری میزان گاز تولیدی در ساعات مختلف، ۵۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های آزمایشی آسیاب شده با غربال ۱ میلی‌متری آسیاب (Tagliapietra *et al*., 2011) در شیشه‌های با حجم ۱۲۵

میلی‌لیتری ریخته شده و با افزودن ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط مایع شکمبه و بافر درب شیشه‌ها با درپوش پلاستیکی و پرس فلزی بسته‌شده و در آون با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. شیشه‌ها هر ۱ ساعت یک‌بار تکان داده شدند. فشار گاز تجمع یافته به کمک فشارسنج (با دقت ۰/۰۲) در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت قرائت و ثبت شد. به‌منظور تصریح گاز تولیدی توسط مایع شکمبه، در هر دور ۵ شیشه فاقد نمونه به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد. حجم گاز تولیدی توسط رابطه رگرسیونی بین حجم و فشار گاز محاسبه‌شده و از بسته نرم‌افزار آماری SAS ۹/۴ رویه NLIN به‌منظور پردازش داده‌ها از رابطه زیر استفاده شد.

$$P= b (1-e^{-ct})$$

به‌منظور تعیین برخی فراسنجه‌های شکمبه‌ای همانند pH، میزان متان تولیدی و قابلیت هضم در ۲۴ ساعت، از انکوباسیون مجزا در هنگام انجام آزمون تولید گاز استفاده شد. مقادیر نمونه، محیط کشت و زمان انجام آزمون کاملاً مشابه فرآیند توصیف‌شده برای آزمون تولید گاز بود. در این آزمون سه فلاسک به ازای هر تیمار ۲۴ ساعت پس از شروع انکوباسیون بازگشایی شد و محتویات باقی‌مانده در داخل شیشه‌ها (مواد هضم‌نشده) با دقت به داخل فالکون ۵۰ میلی‌لیتری تخلیه‌شده (وزن خالی این لوله‌ها قبلاً ثبت شد) و سریعاً pH محتویات داخل آن‌ها با استفاده از pH متر دیجیتالی (مدل Weilheim کشور آلمان) ثبت شد. سپس محتویات داخلی لوله‌های فالکون سانتریفیوژ شده (با سرعت ۲۵۰۰×g ، به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه) و از مایع بالایی آن برای اندازه‌گیری غلظت اسیدهای چرب فرار نمونه‌برداری و به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. اسیدهای چرب فرار با استفاده از دستگاه فام نگار (کروماتوگرافی) گازی با ستون شیشه‌ای (۱/۶۵ متر× ۴/۶ میلی‌متر) با سیلیکای عامل دار شده به طول ۳ متر به روش (Ottenstein & Batler, 1971) اندازه‌گیری شد. سپس مایع بالایی داخل لوله‌ها دور ریخته شد و لوله‌های فالکون به همراه رسوب داخل آن‌ها به آون (۶۵ درجه و به مدت ۴۸ ساعت) منتقل شد تا پس از خشک شدن، فراسنجه‌های مربوط به قابلیت هضم محاسبه شود. سپس پنج فلاسک دیگر بعد از ۲۴ ساعت پس از آغاز انکوباسیون به‌منظور تعیین میزان متان تولیدی مورداستفاده قرار گرفت. به‌منظور برآورد میزان گاز متان، از تزریق ۴ میلی‌لیتر محلول ۱۰ مولار سدیم هیدروکسید و قرائت تفاضل گاز قابل‌اندازه‌گیری، پس از گذشت ۱ دقیقه از تزریق استفاده شد (Demeyer *et al.*, 1988). به‌منظور شمارش جمعیت تک‌یاخته‌ای پنج نمونه یک میلی لیتری از مایع شکمبه پالایش‌شده تهیه و برای تثبیت تک‌یاخته با فرمالین ۵۰ درصد به نسبت ۱:۱ مخلوط و در دمای اتاق نگهداری شد. شمارش تک‌یاخته‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و لام مخصوص با رنگ‌آمیزی متیلن بلو انجام گرفت (Dehority, 2003).

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب یک طرح آماری کاملاً تصادفی بـــا ۵ تیمار و ۵ تکرار انجام گرفت. به‌منظور مقایسه اثر روش‌های مختلف فرآوری بر ترکیبات شیمیایی و مقادیر باقی‌مانده سم دیازینون از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد و داده‌های حاصله با استفاده از رویه GLM یا مدل خطی عمومی نرم‌افزار آماری SAS 9.1 (SAS institute, 2002) و استفاده از مدل آماری (۱)، تجزیه و تحلیل شد:

$$Y_i = \mu + T_i + E_i \qquad (۱)$$

در این مدل Y_i:هرکدام از مشاهدات، μ: میانگین جامعه آماری، T_i: اثر تیمار و E_i: اشتباه آزمایشی.

در طرح آماری مورداستفاده به‌منظور ارزیابی اثر فرآوری‌های مختلف بر فراسنجه‌های تولید گاز، میزان متان تولیدی و فراسنجه‌های شکمبه‌ای، علاوه براثر اصلی تیمار، اثر دور انجام آزمون (Run) نیز مورداستفاده قرار گرفت و داده‌ها در رویه مختلط نرم‌افزار آماری SAS 9.1 (SAS institute, 2002) تجزیه و تحلیل شدند. از مدل آماری (۲) برای تجزیه آماری مورداستفاده قرار گرفت.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + R_j + E_{ij} \qquad (۲)$$

در این مدل Y_{ij}: هرکدام از مشاهدات، μ: میانگین جامعه آماری، T_i: اثر تیمار، R_j: اثر دور انجام آزمون

(ران) و E_{ij}: اشتباه آزمایشی.

در ارتباط با تمامی معادلات مدل، تصحیح میانگین حداقل مربعات با استفاده از آزمون توکی و مقایسه میانگین‌ها با گزینه PDIFF در سطح احتمال آماری ۰/۰۵ درصد انجام‌گرفته و داده‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات و خطای استاندارد مربوطه در جدول‌ها گزارش شد.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی

جدول ۱ نشان‌دهنده اثر فرآوری‌های مختلف بر ترکیب شیمیایی تفاله انگور سفید است. میزان ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی در اثر فرآوری مایکروویو افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای دیگر در تفاله انگور سفید داشت. در اثر فرآوری‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در مقدار پروتئین خام، خاکستر و عصاره اتری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نگردید. همچنین در اثر فرآوری تفاله انگور سفید با جاذب‌ها و اسیدیفایر تفاوت معنی‌داری در ترکیبات شیمیایی آن نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد. گزارش‌شده است که افزایش میزان ماده خشک در اثر پرتو تابی مایکروویو به علت خشک شدن اولیه مواد آزمایشی در محفظه مایکروویو است (Asadnejad, 2015; Kadlec *et al*., 2002). پژوهشگران علت کاهش در مقدار پروتئین خام و افزایش در دیواره سلولی را کمپلکس پروتئین- الیاف ایجادشده در اثر تغییرات شیمیایی ناشی از حرارت در اثر پرتو تابی دانسته‌اند (Alajaji & El-Adawy, 2006; Bressani, 1993). در این تحقیق نیز کاهش عددی در میزان پروتئین خام و افزایش دیواره سلولی می‌تواند ناشی از کمپلکس‌های ایجادشده با سایر ترکیبات شیمیایی در اثر فرآوری مایکروویو باشد. همچنین تشکیل اتصالات عرضی، بین اسیدهای آمینه و قندهای احیا (واکنش میلارد) (Fakhouri & Ramaswamy, 1993) و یا بین پروتئین‌ها (باندهای ایزو و پپتید) (Liardon & Hurrell, 1983) و تغییر حالت دادن پروتئین‌ها در طی فرآوری مایکروویو، می‌تواند مسئول کاهش عددی پروتئین و افزایش دیواره سلولی در این تحقیق باشد. در تطابق با نتایج ترکیبات شیمیایی در این تحقیق، Asadnejad *et al*. (2018) گزارش کردند که فرآوری با پرتو تابی می‌تواند سبب افزایش معنی‌دار ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی در تفاله انگور قرمز گردد.

باقی‌مانده سم دیازینون در تفاله انگورسفید

نتایج مربوط با تأثیر تیمارهای آزمایشی بر باقی‌مانده دیازینون در تفاله انگور در جدول ۲ نشان داده‌شده است. باقی‌مانده سم دیازینون در اثر استفاده از فرآوری مایکروویو، جاذب‌ها و اسیدیفایر کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به تیمار شاهد داشت.

جدول ۱. اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان ماده خشک (درصد) و ترکیبات شیمیایی تفاله انگور سفید (درصد ماده خشک)

Table 1. The effect of experimental treatments on dry matter (%) and chemical composition of white grape pomace (% of DM)

Item	Treatment					SEM	p- value
	1	2	3	4	5		
DM	91.80[b]	94.30[a]	92.17[b]	92.14[b]	92.05[b]	0.47	0.018
Crude protein	12.40	11.75	12.48	12.43	12.56	0.14	0.372
Neutral detergent fiber	50.50[b]	52.85[a]	50.68[b]	50.54[b]	50.44[b]	0.25	0.033
Acid detergent fiber	47.32[b]	49.20[a]	47.20[b]	47.43[b]	47.27[b]	0.30	0.013
Ash	7.20	7.89	7.36	7.31	7.29	0.13	0.228
Ether extract	5.62	5.74	5.48	5.50	5.59	0.10	0.861

تیمارها شامل ۱: شاهد، تفاله انگور بدون فرآوری; ۲: تفاله انگور فرآوری شده با پرتوتابی مایکروویو ۳: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر مایکوفیکس پلاس; ۴: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر بیوتوکس; ۵: تفاله انگور فرآوری شده با اسیدیفایر بیواسید

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

Treatments included 1- control: unprocessed grape pomace 2- grape pomace processed with microwave irradiation 3- grape pomace processed with toxin binder Moycofix-Plus 4- grape pomace processed with toxin binder Bio-Tox 5- grape pomace processed with Bio-Acid

Means within same row with different letters differ significantly (P<0.05).

بیشترین میزان دیازینون باقی‌مانده در تفاله انگور در تیمار شاهد (۳/۸۶ میلی‌گرم در کیلوگرم) مشاهده گردید. در بین تیمارهای آزمایشی بیشترین کاهش (P<۰/۰۵) سم دیازینون در تیمار بیوتوکس (۰/۵۷ میلی‌گرم در کیلوگرم) بود. تفاله انگور فرآوری شده با پرتو تابی ماکروویو و جاذب مایکوفیکس پلاس و اسید آلی (بیو اسید) نیز میزان سم دیازینون باقی‌مانده را به ترتیب به ۲/۲۷، ۱/۴۲ و ۰/۹۸ میلی‌گرم در کیلوگرم کاهش داد (P<۰/۰۵). به‌طورکلی میزان استفاده از سم دیازینون در باغ‌های انگور به دلیل عدم وجود جایگزین مناسب آفت‌کش، نادیده گرفتن پایداری سم، دوره ماندگاری سموم و عدم نظارت کافی در استفاده از سموم در باغ‌ها در حال گسترش است که نتایج سم‌شناسی در آزمایش برون‌تنی این تحقیق دلیلی بر این ادعا است (Pourmahmoud, 2018). میزان باقی‌مانده مجاز[1] سم دیازینون در میوه‌ها ازجمله انگور بر اساس توصیه سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم است (FAO, 2013). به دلیل میزان بالای سم دیازینون باقی‌مانده در تفاله انگور، فقط تیمار حاوی جاذب بیوتوکس توانست سم دیازینون را به میزان باقی‌مانده مجاز برساند. کاهش بیشتر سم دیازینون در تیمار دریافت‌کننده جاذب بیوتوکس می‌تواند مربوط به ساختار این جاذب باشد، به‌طوری‌که جاذب بیوتوکس به‌عنوان یک جاذب سموم آلی با تلفیق آثار سیلیکات‌ها و عصاره دیواره سلولی مخمر (ساکارومایسس سرویزیه) قابلیت جذب طیف وسیعی از سموم را داراست. توکسین بایندرهای آلی بر پایه بتاگلوکان (دیواره داخلی مخمر) دارای ساختار ۱، ۳ و ۱، ۶ بتاگلوکان و مولکول‌های غیرطبیعی و بدون بار است (Moschini *et al*., 2008). این ترکیبات با توجه به ساختار مارپیچی و فنر مانند خود و نیز پیوندهای هیدروژنی و واندروالسی دارای ظرفیت جذبی بالایی برای ترکیب با سموم هستند (Golghsem, 2017). استفاده از پرتو تابی و حرارت به‌عنوان یکی از روش‌های مؤثر در کاهش میزان سموم در میوه‌ها و سبزی‌ها موردمطالعه قرارگرفته است (Golgasem, 2017; Sefidkar & Mazloomi, 2013; Bajwa & Sandhu, 2011). کاهش سم دیازینون در تیمار حاوی مایکوفیکس پلاس می‌تواند به دلیل وجود بنتونیت سدیم در ساختار این جاذب باشد که در کاهش سموم ارگانوفسفره به‌ویژه دیازینون تأثیر بسزایی دارد. بنتونیت به‌عنوان یک اتصال‌دهنده برای سم دیازینون و سایر سموم ارگانوفسفره عمل کرده و می‌تواند به آن متصل شود و از گسترش سم جلوگیری نماید (Azami *et al*., 2017). گزارش‌شده است که بنتونیت سدیم دارای ظرفیت تبادل یونی بالا بوده و می‌تواند با پیوند با کاتیون‌های سموم در کاهش باقی‌مانده آن‌ها مؤثر واقع شود (Kazemi *et al*., 2013). استفاده از ترکیبی از اسید فرمیک، اسید پروپیونیک و اسیدلاکتیک به همراه نمک‌های آمونیوم فرمات و آمونیوم پروپیونات باعث کاهش دیازینون در تیمار حاوی اسیدیفایر بیواسید گردید. گزارش‌شده است که ترکیبات حاوی اسید با توزیع در بدن رشد و فعالیت برخی سموم را سرکوب نموده و توانایی اثر آن‌ها را محدود می‌کنند (Lukstadt, 2014). نتایج کاهش دیازینون باقی‌مانده در اثر استفاده از پرتوتابی مایکروویو، جاذب‌ها و اسیدیفایر در شرایط برون‌تنی در این تحقیق با پژوهش‌های دیگر همخوانی داشت (Golghasem, 2017; Asadnejad, 2015).

حجم گاز تولیدی

میانگین حجم گاز تولیدی در اثر استفاده از روش‌های مختلف فرآوری به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافت (جدول ۳) و روند افزایش تولید گاز با پیشرفت زمان انکوباسیون بیشتر نمایان شد. در بین تیمارهای آزمایشی بیشترین حجم گاز تولیدی در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ به ترتیب ۴۴/۱۵، ۷۵/۶۴، ۸۲/۷۳، ۸۶/۰۶ و ۸۹/۵۳ میلی‌لیتر در تیمار بیوتوکس بود (P<۰/۰۵). در تیمار فرآوری‌شده با پرتوتابی مایکروویو و جاذب مایکوفیکس‌پلاس و اسیدیفایر بیواسید حجم گاز تولیدی در ساعات ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به تیمار شاهد داشت. تولید گاز بخش (b) یا بخش قابل تخمیر در تیمارهای فرآوری‌شده تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) را نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد.

1. Maximum Residue Limit

جدول ۲. باقی‌مانده دیازینون در تیمارهای مختلف آزمایشی

Table 2. Diazinon residues in different experimental treatments

Item	Treatment					SEM	p- value
	1	2	3	4	5		
	Pesticide residues in Feed						
Diazinon (mg/kg)	3.86[a]	2.27[b]	1.42[c]	0.57[e]	0.98[d]	0.39	<0.0001

تیمارها شامل ۱: شاهد، تفاله انگور بدون فرآوری; ۲: تفاله انگور فرآوری شده با پرتوتابی مایکروویو ۳: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر مایکوفیکس پلاس; ۴: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر بیوتوکس; ۵: تفاله انگور فرآوری شده با اسیدیفایر بیواسید

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

Treatments included 1- control: unprocessed grape pomace 2- grape pomace processed with microwave irradiation 3- grape pomace processed with toxin binder Moycofix-Plus 4- grape pomace processed with toxin binder Bio-Tox 5- grape pomace processed with Bio-Acid

Means within same row with different letters differ significantly (P<0.05).

به‌طوری‌که بیشترین (P<۰/۰۵) میزان تولید گاز در بخش (b) در تیمار حاوی جاذب بیوتوکس (۹۵/۰۵) بود. کمترین میزان تولید گاز در بخش قابل تخمیر در تیمار شاهد (۵۳/۷۳) مشاهده شد. بیشتر موارد فعالیت تخمیری میکروارگانیسم‌ها در محیط شکمبه و یا محیط کشت منجر به تولید گاز می‌شود، ازاین‌رو برخی از آفت‌کش‌ها ممکن است بر جمعیت میکروارگانیسم‌ها اثر منفی بگذارند که در نتیجه باعث کاهش تولید گاز در محیط کشت خواهند شد. برخی از مطالعات نشان داده که بعضی از آفت‌کش‌ها اثر مهارکنندگی روی برخی از آنزیم‌های میکروارگانیسم‌ها داشته که از این طریق باعث کاهش عملکرد آن‌ها می‌گردد (Kazemi *et al*, 2013). اگرچه سرنوشت آفت‌کش‌ها در محیط کشت، نیز تحت تأثیر فعالیت میکروب‌های موجود در آن قرار می‌گیرد، ولی برخی آفت‌کش‌ها به سهولت توسط میکروارگانیسم‌ها تجزیه‌شده و برخی دیگر در مقابل تجزیه شدن از خود مقاومت نشان می‌دهند (Finlay *et al*., 1994). در این تحقیق به دلیل سطوح بالای سم دیازینون باقی‌مانده در گروه شاهد که سبب ممانعت از فعالیت میکروارگانیسم‌ها و از دسترس خارج‌کردن برخی پروتئین‌ها در اثر اتصال سم به آن‌ها می‌گردد (Pourmahmoud, 2018)، میزان گاز تولیدی کمتر از تیمارهای فرآوری شده است. Asadnejad (2015) گزارش کرد که فرآوری تفاله انگور سفید به‌وسیله پرتو تابی مایکروویو به‌دلیل تأثیر بر روی دیواره سلولی موجب افزایش تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد. احتمالاً سرعت بالای تولید گاز تحت تأثیر کربوهیدرات‌هایی قرار می‌گیرد که به سهولت در دسترس جمعیت میکروبی قرار می‌گیرند، بنابراین فرآوری مایکروویو می‌تواند در افزایش و در دسترس قرارگرفتن بخش محلول نقش مثبتی داشته و موجب افزایش تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی گردد. نتایج این تحقیق در رابطه با افزایش حجم تولید گاز در اثر استفاده از جاذب‌های مختلف و فرآوری مایکروویو با پژوهش‌های دیگر صورت‌گرفته در این زمینه همخوانی داشت (Golghasem, 2017; Varadyova *et al*., 2003; Kazemi *et al*., 2017). اطلاعات در خصوص تأثیر دیازینون بر محیط کشت بسیار کم است، ولی نتایج آزمایش اخیر نشان داد وجود این سموم باعث کاهش فرآیند تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی شده و روش‌های مختلف فرآوری به‌ویژه جاذب بیوتوکس با از بین بردن و یا کاهش میزان سموم، میزان تولید گاز در اثر بهبود تخمیر را افزایش داد.

اسیدهای چرب فرار تولیدی مایع شکمبه پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون برون‌تنی

نتایج مربوط به الگوی اسیدهای چرب فرار تولیدی، تحت تأثیر تیمارهای مختلف آزمایشی در جدول ۴ نشان داده‌شده است. غلظت کل اسیدهای چرب فرار در تیمار فرآوری شده با پرتو تابی مایکروویو و جاذب‌های مختلف سموم نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). بیشترین میزان اسیدهای چرب فرار مربوط به تیمار ۴ حاوی جاذب بیوتوکس (۵۰/۳۵ میلی مول در لیتر) بود. میزان استات در تمام تیمارهای فرآوری شده نسبت به گروه شاهد کاهش یافت، اما میزان پروپیونات نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). همچنین بیشترین میزان پروپیونات

در تیمارهای حاوی جاذب سموم و اسیدیفایر مشاهده شد. میزان بوتیرات و ایزوبوتیرات در تیمارهای حاوی جاذب سموم و اسیدیفایر نسبت به تیمار شاهد و مایکروویو کاهش یافت (P<۰/۰۵). در مورد سایر اسیدهای چرب فرار اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نگردید. نتایج این بخش مؤید تأثیر مثبت مایکروویو و به‌خصوص جاذب‌های مختلف سموم برافزایش قابلیت تخمیر در اثر کاهش میزان سم دیازینون در تفاله انگور است. گزارش‌شده است که جاذب‌های سموم با کاهش عددی جمعیت تک‌یاخته‌ای سبب افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار و نسبت مولار پروپیونات شده است (pourmahmoud *et al*., 2019a). ازآنجایی‌که بوتیرات و استات محصول نهایی تخمیر توسط جمعیت تک‌یاخته‌ای است، در این تحقیق نیز با کاهش عددی جمعیت تک‌یاخته‌ای نسبت به تیمار شاهد کاهش استات و بوتیرات در فرآوری‌های مختلف مشاهده شد. همچنین از اثرات متابولیت‌های ثانویه انگور (تانن و ساپونین) می‌توان به کاهش استات و افزایش پروپیونات و کاهش نسبت استات به پروپیونات اشاره کرد (Abarghuei & Rouzbehan, 2013). نتایج این تحقیق با پژوهش‌های دیگر همخوانی داشت (Kiyothong *et al*., 2012; Golghasem, 2017).

جدول ۳. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر حجم گاز تولیدی تجمعی و ضرایب تولید گاز تفاله انگور سفید در زمان‌های مختلف (میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)

Table 3. Effect of experimental treatments on the volume of gas formation and the gas production coefficients of white grape pomace at different times (mL per 500 mg of dry matter)

Incubation times	Treatment					SEM
	1	2	3	4	5	
2	4.33	5.49	6.54	6.02	5.46	3.09
4	9.67	10.80	11.51	12.78	9.45	3.09
6	10.90	14.34	15.27	16.85	12.77	3.09
8	13.62	17.66	19.19	21.73	15.94	3.09
10	15.92	19.30	21.09	23.46	17.87	3.09
12	16.27	19.85	22.77	25.65	19.02	3.09
24	26.79^{c}	34.39^{bc}	37.08^{ab}	44.15^{a}	34.95^{bc}	3.09
48	38.87^{c}	51.93^{b}	56.04^{ab}	64.75^{a}	54.13^{b}	3.09
72	47.65^{c}	63.17^{b}	68.41^{b}	82.73^{a}	63.36^{b}	3.09
96	49.18^{c}	66.20^{b}	71.36^{b}	86.06^{a}	65.41^{b}	3.09
120	50.76^{c}	68.20^{b}	72.36^{b}	89.53^{a}	68.20^{b}	3.09
Parameters						
b	53.73^{c}	72.02^{b}	76.58^{b}	92.05^{a}	71.11^{b}	3.23
c	0.026	0.027	0.027	0.026	0.028	0.001

تیمارها شامل ۱: شاهد، تفاله انگور بدون فرآوری; ۲: تفاله انگور فرآوری شده با پرتوتابی مایکروویو; ۳: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر مایکوفیکس پلاس; ۴: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر بیوتوکس; ۵: تفاله انگور فرآوری شده با اسیدیفایر بیواسید

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

Treatments included 1- control: unprocessed grape pomace 2- grape pomace processed with microwave irradiation 3- grape pomace processed with toxin binder Moycofix-Plus 4- grape pomace processed with toxin binder Bio-Tox 5- grape pomace processed with Bio-Acid.
Means within same row with different letters differ significantly (P<0.05).

جدول ۴. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر الگوی اسیدهای چرب فرار تولیدی در محیط برون‌تنی در 24 ساعت انکوباسیون

Table 4. Effects of experimental treatments on volatile fatty acid (VFA) profile after 24 hours of *in vitro* incubation

Item	Treatment					SEM	P-value
	1	2	3	4	5		
Total VFA (m mol/lit)	46.14^{d}	47.84^{c}	49.23^{b}	50.35^{a}	48.81^{b}	0.49	0.002
Acetate (%)	59.35^{a}	58.04^{b}	57.83^{b}	57.55^{b}	57.79^{b}	0.23	0.040
Propionate (%)	17.66^{c}	19.21^{b}	20.76^{a}	20.88^{a}	20.41^{a}	0.42	0.003
Isobutyrate (%)	2.42^{a}	2.27^{a}	1.82^{b}	1.75^{b}	1.93^{b}	0.10	0.001
Butyrate (%)	16.52^{a}	15.88^{a}	14.21^{b}	14.05^{b}	14.36^{b}	0.34	0.030
Isovalerate (%)	1.71	1.67	1.46	1.60	1.68	0.14	0.910
Valerat*e* (%)	3.02	2.91	2.82	2.60	2.42	0.15	0.830

تیمارها شامل ۱: شاهد، تفاله انگور بدون فرآوری; ۲: تفاله انگور فرآوری شده با پرتوتابی مایکروویو ۳: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر مایکوفیکس پلاس; ۴: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر بیوتوکس; ۵: تفاله انگور فرآوری شده با اسیدیفایر بیواسید

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

Treatments included 1- control: unprocessed grape pomace 2- grape pomace processed with microwave irradiation 3- grape pomace processed with toxin binder Moycofix-Plus 4- grape pomace processed with toxin binder Bio-Tox 5- grape pomace processed with Bio-Acid.
Means within same row with different letters differ significantly (P<0.05).

میزان تولید متان و فراسنجه‌های شکمبه‌ای

داده‌های مربوط به میزان تولید متان و فراسنجه‌های شکمبه‌ای در جدول ۵ گزارش‌شده است. تولید متان تحت تأثیر فرآوری‌های مختلف افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه شاهد نشان داد. بیشترین میزان متان در تیمارهای حاوی جاذب مایکوفیکس‌پلاس و بیوتوکس به ترتیب ۳۳/۳۷ و ۳۳/۸۱ (میلی‌لیتر در ۵۰۰ گرم ماده خشک) بود (P<۰/۰۵). گزارش‌شده است که تک‌یاخته‌ها به‌صورت غیرمستقیم در تولید گاز متان از طریق فراهم آوردن هیدروژن برای باکتری متانوژنز نقش دارد (Finlay *et al*., 1994)؛ بنابراین مهار تک‌یاخته‌ها می‌تواند منجر به کاهش تولید گاز متان گردد. افزایش مقدار متان در تحقیق حاضر را می‌توان به کاهش تانن‌های متراکم در تفاله انگور به دلیل فرآوری تفاله با پرتو تابی مایکروویو و تأثیر مثبت جاذب‌ها در کاهش سم دیازینون و به‌تبع آن کاهش آثار منفی آن‌ها بر قابلیت تخمیر، جمعیت تک‌یاخته‌ای و متانوژن‌ها نسبت داد. در تحقیق حاضر نیز کاهش عددی در جمعیت تک‌یاخته‌ای مشاهده شد، ولی این تفاوت ازلحاظ آماری معنی‌دار نبود. با توجه به افزایش تولید گاز در اثر فرآوری‌های مختلف و افزایش هم‌زمان غلظت کل اسیدهای چرب فرار، بخشی از افزایش در تولید متان را می‌توان به افزایش قابلیت هضم الیاف و سایر مواد مغذی نسبت داد.

pH تیمار ۵ به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. در تیمار ۵ از اسید آلی (بیو اسید) به‌عنوان یک اسیدیفایر استفاده شد که دارای برخی اسیدهای آلی و نمک‌های آن با ترکیب اسیدفرمیک، اسید پروپیونیک و اسیدلاکتیک و نمک‌های آمونیوم فرمات و آمونیوم پروپیونات است (Lukstadt, 2014)، لذا احتمالاً کاهش pH در این تیمار به دلیل وجود برخی اسیدهای موجود در ترکیب آن است. Varadyova (2003) گزارش کرد که افزودن بنتونیت به جیره نشخوارکنندگان pH شکمبه را کنترل کرده و سبب بهبود تخمیر شکمبه‌ای می‌گردد. تغییرات pH در اثر فرآوری‌های مختلف با نتایج برخی محققان همخوانی داشت (Azami *et al*., 2017; Kazemi, 2012). جمعیت تک‌یاخته‌ای شکمبه تحت تأثیر تیمارهای مختلف آزمایشی قرار نگرفت. فرآوری‌های مختلف سبب افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) قابلیت هضم ماده خشک بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط برون‌تنی شد. بیشترین میزان قابلیت هضم ماده خشک در تیمار حاوی جاذب بیوتوکس (۳۹/۷۵) بود (P<۰/۰۵). این افزایش قابلیت هضم با افزایش پتانسیل تولید گاز و مقادیر تولید اسیدهای چرب فرار همبستگی مثبتی داشته و می‌تواند نشانگر نقش مثبت فرآوری‌های مختلف در از بین بردن آثار منفی سم دیازینون و تانن تفاله انگور و افزایش قابلیت هضم به‌واسطه افزایش دسترسی به الیاف خوراک باشد (Menke and Steingass, 1988). در مطالعه‌ای که بر روی سموم مختلف در شرایط برون‌تنی انجام گرفت گزارش شد که این سموم سبب کاهش قابلیت هضم ماده خشک می‌گردند (Schwartz *et al*., 1973). Kazemi *et al*. (2012) گزارش کردند که سم دیازینون در شرایط برون‌تنی سبب کاهش قابلیت هضم ماده خشک می‌گردد.

جدول ۵. اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های تخمیری در مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون

Table 5. Effects of experimental treatments on fermentation parameters after 24 hours of incubation

Fermentation Parameters	Treatment					SEM	P-value
	1	2	3	4	5		
Methane (ml/500 mg DM)	29.19[c]	32.43[b]	33.37[a]	33.81[a]	33.07[ab]	0.55	0.001
pH	6.90[a]	6.89[a]	6.86[a]	6.86[a]	6.67[b]	0.03	0.013
protozoa population ($\times 10^5$/ml)	12.50	12.09	11.46	11.15	11.43	0.27	0.58
DM Digestibility (%)	36.17[c]	37.40[b]	37.83[b]	39.75[a]	37.71[b]	0.40	0.003

تیمارها شامل ۱: شاهد، تفاله انگور بدون فرآوری; ۲: تفاله انگور فرآوری شده با پرتوتابی مایکروویو ۳: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر مایکوفیکس پلاس; ۴: تفاله انگور فرآوری شده با توکسین بایندر بیوتوکس; ۵: تفاله انگور فرآوری شده با اسیدیفایر بیواسید

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

Treatments included 1- control: unprocessed grape pomace 2- grape pomace processed with microwave irradiation 3- grape pomace processed with toxin binder Moycofix-Plus 4- grape pomace processed with toxin binder Bio-Tox 5- grape pomace processed with Bio-Acid

Means within same row with different letters differ significantly (P<0.05).

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از پرتو تابی مایکروویو و جاذب‌های مختلف سموم باعث کاهش معنی‌دار سم دیازینون باقی‌مانده در تفاله انگور گردید. فرآوری‌های مختلف سبب بهبود فراسنجه‌های شکمبه‌ای موردبررسی در این تحقیق شدند و با توجه به یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که جاذب بیوتوکس بیشترین تأثیرگذاری را داشت.

REFERENCES

1. Aazami, M.H., Tahmasbi, A.M., Forouhar, V. & Naserian, A.A. (2017). Effects of Sodium Bentonite on Blood Parameters, Feed Digestibility and Rumen Fermentation Parameters of Male Balouchi Sheep Fed Diet Contaminated by Diazinon, an Organophosphate Pesticide. *Iranian journal of Applied Animal Science*, 7(3), 421-428.
2. 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. (in Farsi)
3. Abarghuei, M. J., Rouzbehan, Y. & Alipour, D. (2010). The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, 132 (1), 73-79.
4. Aghajanzadeh-Golshani, A., Maheri-Sis, N., Mirzaei-Aghsaghali, A. & Baradaran Hasanzadeh, A. R. (2010). Comparison of nutritional value of tomato pomace and brewers grain for ruminants using in vitro gas production technique. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5, 43-51.
5. Alajaji, S. A. & El-Adawy, T. A. (2006). Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 10, 3-15.
6. Asadnejad, B. (2015). *Effects of Microwave, Gamma and Electron irradiation on biomarkers of nutritive value of apple pomace, grape pomace and pourea pomacein ruminant nutrition in vitro and in situ*. Ph.D. Thesis. Urmia university.
7. Asadnejad, b., Pirmohammadi, R. & Khalilvandi Behroozyar, H. (2018). Effects of electron irradiation on nutritional value of red grape pomace using in vitro and in situ nylon bags techniques. *Journal of Ruminant Research*, 6, 31-48. (in Farsi)
8. Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official methods of analysis*. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem. Arlington, VA.
9. Bajwa, U. & Sandhu, K. S. (2011). Effect of handling and processing on pesticide residues in Food-a review. *Journal of Food Science Technology*, (5), 1-20.
10. Baratian Ghorghi, Z., Sadeghi Mahoonak, A. R., Ghorbani, M. & Shaeghi, M. (2014). Effect of tomato paste production stages on decreasing diazinon residue. *Journal of Food Science and Technology*, 46(12), 177-186. (in Farsi)
11. Baumgartel, T., Kluth, H., Epperlein, K. & Rodehutscord, M. (2007) A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. *Small Ruminant Research*, 67, 302-306.
12. Bressani, T. (1993). Grain quality of common beans. *Food Review International*. 9, 237–297.
13. Cengiz, M. F., Certel, M., & Gocmen, H. (2006). Residue contents of DDVP (Dichlorvos) and diazinon applied on cucumbers grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. *Food Chemistry*, 98, 127-135.
14. Debski, B., Kania, B. F. & Kuryl, T. (2007). Transformations of diazinon, an organophosphate compound in the environment and poisoning by this compound. *Ekológia*. 26(1), 68.
15. Dehority, B. A. (2003). *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
16. Demeyer, D., De Meulemeester, M., De Graeve, K., & Gupta, B. W. (1988). Effect of fungal treatment on nutritive value of straw. *Journal of Mededelingen van de Faculteit*, 53, 1811–1819.
17. Fakhouri, M. O. & Ramaswamy, H. S. (1993). Temperature uniformity of microwave heated foods as influenced byproduct type and composition. *Food Research International.* 26, 89–95.
18. FAO. (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy**.**
19. FASS. (2010). *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. 3rd rev. ed. Federation of Animal Sciences Societies Savoy, IL.
20. Fattahi, E. (2017). Investigating the Effect of Diazinon Poison on Sex Hormone Serum Levels and Ovarian Follicle in Female Rats. *Journal of Fasa University of Medical Sciences***,** 7(2), 233-240. (in Farsi)
21. Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M. & Hirt, R. R. (1994). Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 117, 157-162.
22. Gaikwad, A. S., Karunamoorthy, P., Kondhalkar, S. J., Ambikapathy, M. & Beerappa, R. (2015). Assessment of hematological, biochemical effects and genotoxicity among pesticide sprayers in grape garden. *International Journal* of *Occupational Medicine and Toxicology*, 10, 1-11.

23. Golghasem gharehbagh, A. (2017). *Investigation of the effects of different processing methods and feed additives on patulin and pesticides residues concentration on apple pomace and its effects on ruminal fermentation and fermentative parameters in vitro, milk yield and composition and some of the blood metabolites in Mohabadi lactating does*. Ph.D. Thesis. Urmia university.
24. Hadian, Z., Azizi, M. H. & Ferdosi, R. (2006). Determination of chlorinated pesticide residues in vegetables by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Food Science and Technology*, 3(1), 67-74.
25. Iranian National Standard Organization. (2013). *Iran good agricultural practices*, (Iran GAP) -Olive. 16542.
26. Kadlec, P., Kaasova, J., Dostalova, J., Zatopkova, M., Hosnedl, V. & Hrachovinova, J. (2002). Microwave treatment on drying of germinated pea. *Czech Journal of Food Science*, 21, 23-31.
27. Karami, M., Pashayi, S. & Esmaili, R. (2019). The evaluation of Malathion and Diazinon residues in pickled olive during preparation and production. *Journal of Food Science and Technology*, 49(4) 167-184. (in Farsi)
28. Kazemi, M., Eskandary, A., Tahmasbi, A. M., Valizadeh, R. & Naserian, A. A. (2017). Effects of phosalone consumption via feeding with or without sodium bentonite on performance, blood metabolites and its transition to milk of Iranian Baluchi sheep. *Journal of Animal Science and Technology*, 59, 10
29. Kazemi, M., Tahmasbi, A. M., Valizadeh, R., Naserian, A. A. & Sonei, A. (2013a). Toxicological effects of diazinon as an organophosphate pesticide on fermentation activity of microorganisms and evaluation of sodium bentonite as a toxin binder by using the in vitro batch culture. *Journal of Agriculture and Food Science*, 4, 52-58.
30. Kazemi, M., Tahmasbi, A. M., Valizadeh, R., Naserian, A . A., Afshari, R. & Sonei, A. (2013b). Effect of Phosalone as an Organophosphate Pesticide with Different Levels of Bentonite on Fermentation Parameters of a TMR Ration According to in vitro Condition. *Iranian Journal Of Animal Science Research*. 3(5), 201-209.
31. Kiyothong, K., Rowlinson, P., Wanapat, M. & Khampa, S. (2012). Effect of mycotoxin deactivator product supplementation on dairy cows. *Animal Production Science*, 52, 832–841.
32. Kazemi, M. (2012). *Effects of organophosphate pesticides via feeding with or without sodium bentonite on performance, blood metabolites and its transition to milk*. Ph.D. Thesis. Ferdowsi University of Mashhad.
33. Khatooni, M. A., Nobar, R. S. D. & Cheraghi, H. (2014). Evaluating Possibility Replacement of By-Product of Apple Pomace with Barley Grain for Ruminants by In Vitro Gas Production Technique. *Journal of Animal Science advance*, 4(5), 839-844.
34. Liardon, R. & Hurrell, R. F. (1983). Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 31, 432–437.
35. Lukstadt, C. (2014). *Acidifiers in Animal Nutrition: A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance. Published in*: Technology, Business, Nottingham University Press.
36. Menke, K. H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Journal of Animal Research*, 28, 37-55.
37. Menke, K. H., Rabb, L., Saleweski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schnider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feed stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Jornal of Agricaltural Science. Camb*, 93 (1), 217-222.
38. Moschini, M., Gallo, A., Piva, G. & Masoero, F. (2008). The effects of rumen fluid on the in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and in vivo release of the sequestered toxin. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 292–309.
39. Ottenstein, D. M. & Batler, D. A. (1971). Improved gas chromatography separation of free acids C2-C5 in dilute solution. *Analytical Chemistry*, 43, 952-955.
40. Pourmahmoud, B., Pirmohammadi, R. & Khalilvandi Behroozyar, H. (2019a). Effectiveness of toxin adsorbents on Diazinon residues in grape pomace and its effects on intake, and ruminal and blood parameters in lactating goats. *Iranian Journal of Animal Science*, 49(4), 505-516. (in Farsi)
41. Pourmahmoud, B., Pirmohammadi, R. & Khalilvandi Behroozyar, H. (2019b). Effects of Different Toxin Adsorbents on the Amount of Diazinon Residue in White Grape Pomace and Milk Production and Composition and Toxin Residues in Mohabadi Lactating Goats. *Iranian journal of Applied Animal Science*, 9(4), 677-685.
42. Pourmahmoud, B. (2018). *Effects of microwave irradiation and different adsorbents on Patulin and pesticides residues concentration of grape pomace and its effects on Mohabadi lactating goats in the transition period*. Ph.D. thesis. Urmia University.

43. Rezaee, M., Rezaeian, M., Mirhadi, S. A. & Moradi, M. (2008). Effects of yeast supplementation on rumen fermentation, microbial population and the performance of male fattening calves. *Journal of Veterinary Research*, 62, 403-409. (in Farsi)
44. Sargazi, Z., Nikravesh, M. R., Jalali, M., Sadeghnia, H. R. & Rahimi Anbarkeh, F. (2016). Apoptotic Effect of Organophosphorus Insecticide Diazinon on Rat Ovary and Protective Effect of Vitamin E. Iranian Journal of Toxicology, 10(2), 37-44.
45. SAS Institute. (2002). User's Guide: Statistics. Version 9.1 Edition. SAS Inst., Cary, NC, USA.
46. Schipper, P. N., Vissers, M. J. & Van Der Linden, A. M. (2008). Pesticides in groundwater and drinking water wells: overview of the situation in the Netherlands. *Water Science and Technology*, 57(8), 1277-1286.
47. Schwartz, C. C., Nagy, J. G., & Streeter, C. L. (1973). Pest icide Effect on Rumen Microbial Function. *Journal of Animal Science*, 37, 821-826.
48. Sefidkar, R. & Mazloomi, S. M. (2013). A review of the effects of different types of food processing methods on the amount of pesticides residues in raw and processed plant-based food. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 22(6), 24-33.
49. Theodorou, M., Williams, B., Dhanoa, M., McAllan, A. & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(4), 185-197.
50. Tagliapietra, F., Cattani, M., Hansen, H., Hindrichsen, I., Bailoni, L. & Schiavon, S. (2011). Metabolizable energy content of feeds based on 24 or 48 h in situ NDF digestibility and on in vitro 24 h gas production methods. *Jornal of Animal Feed Science and Technology*, 170(3), 182-191.
51. Van Soest, P.J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in ration to animal nutrition. *Jornal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597.
52. Varadyova, Z., Baran, M., Siroka, P. & Styriakova, I. (2003). Effect of silicates minerals (Zeolite, bentonite, kaolin, granite) on in vitro fermentation of amorphous cellulose, meadow hay and wheat straw and barley. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 116 (7-8), 317-321.