مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۳ شماره ۴/ سال۱۴۰۲/ صفحات ۶۱ تا ۸۱
DOI: 10.22034/AS.2022.49527.1643

اثرات استفاده از مخمر ساکارومایسس سرویسیا به‌عنوان زیست‌یار بر فراسنجه‌های تخمیر در جیره‌های پرکنسانتره در شرایط برون‌تنی

الناز پیرعدل[۱]، حامد خلیل‌وندی بهروزیار*[۲]، مهدی کاظمی بن‌چناری[۳]، رسول پیرمحمدی[۴]، مرتضی حسینی غفاری[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۱۵

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
[۲] استادیار گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه
[۳]دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه اراک
[۴] استاد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه
[۵]دستیار تحقیقاتی موسسه تحقیقاتی علوم دامی دانشگاه بن آلمان
*مسئول مکاتبه: Email: h.khalilvandi@urmia.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: مخمر ساکارومایسس سرویسیا یکی از متداول ترین زیست یارها بوده که در تغذیه نشخوارکنندگان مورد استفاده قرار می‌گیرد. پژوهش حاضر، به منظور مطالعه‌ی اثرات متقابل مخمر و سطح کنسانتره جیره بر فراسنجه‌های تخمیر، جمعیت میکروارگانیسم‌های مؤثر در تجزیه الیاف و میزان عوامل التهاب زای تولیدی در شکمبه در جیره‌های حاوی مقادیر بالای کنسانتره در شرایط برون‌تنی انجام گرفت. **روش‌کار:** اثر ٤ سطح مخمر، صفر، ٤، ٨ و ١٢ میلی‌گرم در گرم مکمل مخمر ساکارومایسس سرویسیا در دو نوع متفاوت از جیره‌ی کاملاً مخلوط حاوی ٦٠ و ٧٠ درصد کنسانتره، بر کینتیک و فراسنجه‌های تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای با استفاده از سه رأس گوساله فیستولادار بررسی شد. علاوه بر این تأثیر افزودن مخمر بر غلظت لاکتات و اندوتوکسین‌های لیپو پلی ساکاریدی، جمعیت پروتوزوآ، قارچ‌های بی‌هوازی و میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده‌ی الیاف در شرایط برون‌تنی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** افزودن سطوح مختلف مخمر سبب افزایش ($P<0/05$) میزان گاز تولیدی و اسیدهای چرب فرار با افزایش مدت زمان انکوباسیون در جیره‌ها شد. نتایج نشان داد افزودن مخمر در جیره‌های کاملاً مخلوط حاوی سطوح بالای ترکیبات قابل تخمیر سریع، سبب افزایش پایداری محیط شکمبه و در نهایت افزایش ($P<0/05$) میزان گاز بالقوه تولیدی از بخش نامحلول، کاهش ($P<0/05$) نرخ تولید گاز و کاهش ($P<0/05$) فاز تأخیر قبل از شروع فرایند تخمیر شد. علاوه بر این مخمر با کاهش غلظت لاکتات و لیپوپلی ساکاریدها سبب ثبات بیشتر در محیط شکمبه و کاهش خطر ایجاد ناهنجاری‌های متابولیکی، افت چربی شیر و آسیب‌های بافتی و کبدی می‌شود. **نتیجه‌گیری نهایی:** مخمر با پایدارتر کردن محیط شکمبه، کاهش غلظت لاکتات و کاهش میزان لیپو پلی ساکاریدهای تولیدی در شکمبه و تحریک رشد و فعالیت پروتوزوآ و میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده‌ی الیاف، سبب بهبود گوارش - پذیری الیاف شد.

واژگان کلیدی: تولید گاز، گوارش پذیری الیاف، لاکتات، لیپو پلی ساکارید، میکروارگانیسم‌های سلولایتیک

مقدمه

در دهه‌های اخیر، علاوه بر استفاده از پروبیوتیک‌ها در تغذیه انسان، از آن‌ها در تغذیه حیوانات مزرعه‌ای به‌خصوص نشخوارکنندگان به عنوان عامل محافظت کننده حیوان در مقابل بیماری‌ها، محرک رشد، اصلاح‌کننده تخمیر شکمبه در نشخوارکنندگان و بهبود تولید حیوانات استفاده می‌شود (پور عباسعلی و همکاران ۲۰۰۷). مخمر ساکارومایسس سرویسیا یکی از متداول‌ترین زیست‌یارها بوده که در تغذیه نشخوارکنندگان استفاده می‌شود. ساکارومیسس سرویسیا جزء زیر گروه آسکومیکوتینا و از خانواده ساکارومایستاسیا و زیر خانواده ساکاروماستودیا و جنس ساکارومایسس‌ها و گونه سرویسیا است (نیکخواه و همکاران ۲۰۰٤). از این رو یکی از اهداف مهم متخصصین تغذیه دام علاوه بر تأمین نیازهای غذایی نشخوارکنندگان بهبود وضعیت تخمیر در شکمبه آن‌ها بوده مواد افزودنی میکروبی که اصطلاحاً به آن پروبیوتیک (زیست‌یار) می‌گویند، موجودات زنده‌ای هستند که به عنوان مکمل به خوراک حیوانات افزوده می‌شود (فولر ۱۹۹۲). محققین به دنبال یافتن راه کارهای طبیعی برای افزایش فعالیت شکمبه از طریق بهبود باکتری‌های مفید شکمبه هستند (راسل ۲۰۰۲). محیط کشت مخمر تغذیه شده به نشخوارکنندگان، تولید گاو شیری، گوسفند و گاو گوشتی و همچنین پایداری تخمیر شکمبه تحت شرایطی از قبیل اسیدوز شکمبه را افزایش می‌دهد (هولدر ۲۰۰۷). یکی از متداول‌ترین پروبیوتیک‌ها که به طور وسیعی در کشورهای مختلف استفاده شده مخمر ساکارومایسس سرویسیا است، این مخمر یک پروبیوتیک غیر باکتریایی بوده که به دلیل وجود اسیدهای دی کربوکسیلیک چرخه کربس مانند فومارات و مالات در مخمر سبب مصرف بیشتر لاکتات در باکتری‌های مصرف‌کننده لاکتات شده از این راه می‌تواند غلظت لاکتات در شکمبه را کاهش داده و به تبع باعث افزایش عملکرد می‌شود (پورعباسعلی و همکاران ۲۰۰۷). بررسی‌ها نشان داده که جذب هگزوزهایی نظیر گلوکز، فروکتوز، مانوز توسط سلول‌های مخمر ساکارومایسس سرویسیا وابسته به پروتئین‌های انتقال‌دهنده‌های هگزوز غشایی است. این پروتئین‌ها جزء پروتئین‌های انتگرال غشایی بوده که پروتئین‌های انتگرال معمولاً کروی هستند و به خودی خود آمفی‌پاتیک هستند. انتقال قند از عرض غشای پلاسمایی اولین مرحله ضروری در متابولیسم قند در ساکارومایسس سرویسیا است (کراکبرگ و بایسون ۱۹۹۰ و جانسون و کیم ۲۰۰۵). ساکارومایسس سرویسیا دارای چندین انتقال دهنده هگزوز بوده که انتقال گلوکز، فروکتوز و مانوز را از طریق انتشار تسهیل شده بر عهده دارند. ژن‌های ناقل هگزوز الگوی بیان متفاوتی داشته و تنظیم آن‌ها به شدت تحت ویژگی کینتیک انتقال‌دهنده بوده و گلوکز اولین فاکتور کنترل کننده بیان این ژن‌ها است علاوه بر این فاکتور، عواملی مثل فشار اسموتیک، گرسنگی و حالت فیزیولوژیکی نیز در بیان این ژن تأثیر دارد (کو و همکاران ۱۹۹٦ و پیترز و همکاران ۲۰۰۵). بررسی‌های فیزیولوژیک سلول‌های مخمر نشان داده است که یون‌های آمونیوم به طور فعال توسط سلول‌های مذکور جذب و مستقیماً به چند اسیدآمینه به خصوص گلوتامین و گلوتامیک تبدیل شده و این ترکیبات به عنوان پیش ساز سایر اسیدهای آمینه به کار می‌رود. بنابراین احتمالاً بر الگوی اسیدهای آمینه ورودی به روده باریک تأثیر گذار است (پورعباسعلی و همکاران ۲۰۰۷). با توجه به این‌که هم بستگی بالایی بین سطح آمونیاک مایع شکمبه با سطح ازت اوره‌ای خون وجود دارد، کاربرد مخمر سطح ازت اوره‌ای خون را تحت تأثیر قرار می‌دهد. البته آزمایش‌هایی وجود دارد که بر بی‌تأثیر بودن مخمر بر سطح آمونیاک اشاره دارند (پورعباسعلی و همکاران ۲۰۰۷). مخمرها از طریق افزایش تعداد باکتری‌های گرم مثبت

باعث افزایش مصرف اکسیژن در شکمبه شده و از طریق بهبود تولید پروپیونات از لاکتات و درنهایت افزایش سطح تولید گلوکز کبدی (تبدیل پروپیونات به گلوکز) و همچنین تولید استات باعث تغییر در جمعیت باکتری‌های شکمبه و بهبود ثبات و عملکرد شکمبه و افزایش سنتز پروتئین میکروبی می‌شوند (دهقان بنادکی و همکاران ۲۰۱۲). علاوه بر این، محصولات کشت مخمر حاوی متابولیت‌های تخمیری ساکارومایسس سرویسیه (ویتامین‌های B، اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی) بوده و دارای اثرات مفیدی در شکمبه مانند افزایش pH، افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار (ویلیامز و همکاران ۱۹۹۱)، افزایش تعداد باکتری‌های سلولایتیک (کلاوی و مارتین ۱۹۹۷)، کاهش غلظت آمونیاک شکمبه (استراهلین ۲۰۰۳) و افزایش نرخ هضم الیاف شکمبه‌ای (کلاوی و مارتین ۱۹۹۷) است. مشکلی که در رابطه با استفاده از محصولات مخمر وجود دارد این است که میزان اثربخشی محصولات مخمر بسیار متغیر بوده (میلر و همکاران ۲۰۰۲) و ممکن است به نوع جیره (ویلیامز و همکاران ۱۹۹۱) مقدار مخمر استفاده شده، مرحله‌ی فیزیولوژیکی حیوان، سیستم خوراک‌دهی (پاترا ۲۰۱۲) و همچنین سویه‌ی مخمر مورد استفاده در محصول (نیوبلد و همکاران ۱۹۹۵) وابسته است. محققان نتیجه‌گیری کردند که مصرف اکسیژن موجود در شکمبه به عنوان حداقل فعالیت مخمر ساکارومایسس سرویسیا در شکمبه، مطرح می‌شود. هر چند تمام این تأثیرات در همه‌ی آزمایش‌ها مشاهده نشده و نتایج به نوع سویه‌ی مخمر انتخابی نیز بستگی دارد (نیوبلد و همکاران ۱۹۹۵). مخمر ساکارومایسس سرویسیا منجر به حذف و مصرف شدن اکسیژن موجود در محیط شکمبه و همچنین آزاد شدن برخی آنزیم‌های ضروری، ویتامین‌ها و سایر مواد مغذی و عوامل رشد شده که این عوامل به حیات و فعالیت مناسب میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای در محیط شکمبه کمک شایانی می‌کند (دیانگ و همکاران ۲۰۰۸). از طرفی در محیط شکمبه پروتوزوآها خاصیت صیادی نسبت به باکتری‌ها داشته و فعالیت پروتئولیتیکی شدیدی دارند. اگرچه پروتوزوآها در تخمیر در شکمبه‌ای نقش ضروری ندارند، غالباً در هضم الیاف مؤثر بوده و از افت شدید pH شکمبه جلوگیری می‌کند (دهوریتی و همکاران ۱۹۷۹). اگرچه ارزش بیولوژیکی پروتئین پروتوزوآیی و باکتریایی یکسان بوده، اما گوارش پذیری پروتئین پروتوزوآیی به طور معنی‌داری بیشتر است (دهوریتی و همکاران ۱۹۷۹). pH بالای شکمبه در اثر مصرف محصولات تخمیری ساکارومایسیس سرویسیا، از جابجایی مسیرهای زیست هیدروژنه شدن در شکمبه جلوگیری کرده و از این طریق افت چربی شیر را به واسطه افزایش جمعیت باکتری‌های سلولایتیک و افزایش هضم الیاف و تولید استات، در شکمبه کاهش می‌دهد (اولاگارای و همکاران ۲۰۱۹). افزودن مخمرها یا محیط کشت مخمرها می‌تواند به‌واسطه افزایش رشد باکتری‌های مصرف کننده لاکتات و افزایش pH مایع شکمبه و ایجاد شرایط مناسب برای رشد باکتری‌های هضم کننده سلولز، سبب افزایش گوارش پذیری ماده خشک می‌شود (حسینی و همکاران ۲۰۱۲؛ تریپاسی و کریم ۲۰۱۰ و فرانسیا و همکاران ۲۰۰۸). با این حال مطالعه‌ای در ارتباط با اثر متقابل افزودن سطوح مختلف مخمر ساکارومایسس سرویسیا و سطوح مختلف کنسانتره در جیره غذایی وجود ندارد. بنابراین هدف پژوهش حاضر، مطالعه‌ی اثرات سطوح مختلف مکمل مخمری ساکارومایسیس سرویسیا بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، جمعیت میکروارگانیسم‌های فعال در گوارش الیاف در شکمبه، گوارش‌پذیری مواد مغذی، میزان تجمع لاکتات و لیپوپلی‌ساکاریدها به عنوان یکی از مهم‌ترین اندوتوکسین‌های باکتریایی در شکمبه در اثر تخمیر جیره‌های حاوی مقادیر بالای کنسانتره در شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

محل اجرا و حیوانات مورداستفاده در آزمایش

مکمل مخمری مورداستفاده در این پژوهش با نام تجاری ساکارومایسیس سرویسیا یوپرو (U- Pro) محصول شرکت دانش‌بنیان تک ژن زیست بود. این آزمایش در مزرعه آموزشی- پژوهشی و آزمایشگاه تغذیه دام دانشگاه ارومیه در طی ماه‌های فروردین تا تیرماه سال ۱۳۹۹ انجام شد. حیوانات مورداستفاده در این آزمایش بر اساس راهنمای نگهداری و استفاده از حیوانات مزرعه‌ای در تحقیقات علوم دامی (۲۰۱۰) FASS و تحت نظارت انجمن اخلاق زیستی دانشگاه ارومیه نگهداری شدند. بر اساس اهداف پژوهش حاضر، اثر ٤ سطح مخمر ساکارومایسس سرویسیا (صفر، ٤، ۸ و ۱۲ میلی‌گرم در گرم ماده خشک خوراک کاملاً مخلوط) در دو نوع متفاوت از جیره‌ی کاملاً مخلوط حاوی ٦۰ و ۷۰ درصد کنسانتره (جدول ۱)، بر کینتیک و فراسنجه‌های تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای شامل pH، نیتروژن آمونیاکی، غلظت و الگوی اسیدهای چرب فرار، میزان تجمع لاکتات و اندوتوکسین لیپو پلی ساکارید، میزان گوارش پذیری حقیقی ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و جمعیت نسبی میکروارگانیسم‌های دخیل در فرایند گوارش شکمبه‌ای الیاف مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور انجام آزمایش‌های آزمون تکنیک تولید گاز، از سه رأس گوساله نر بالغ و اخته شده نژاد هلشتاین با میانگین وزن ٥۲۰±٥ کیلوگرم و ٤ ساله مجهز به فیستولای شکمبه‌ای استفاده شد. جیره مصرفی با استفاده از نرم افزار (CNCPS V5) تنظیم و در سطح ۲۰ درصد بالاتر از نیاز انرژی نگهداری (۱۹۹۵) AFRC در دو وعده صبح و عصر در ساعات ۰۸۰۰ و ۱۸۰۰ در اختیار حیوانات قرار گرفت. جیره مصرفی شامل یونجه خردشده، ذرت علوفه‌ای سیلو شده و ترکیب کنسانتره‌ای با ۱۸ درصد پروتئین خام به نسبت ۱ به ۱ علوفه به کنسانتره بود. حیوانات در جایگاه انفرادی نگهداری شدند و آب و سنگ نمک در طول شبانه روز به صورت اختیاری در دسترس آن‌ها قرار گرفت.

آزمون تولید گاز

به منظور تعیین اثر افزودن سطوح مختلف مخمر بر میزان گاز تولیدی در آزمایشگاه از روش تعیین فشار گاز تولیدی بر اساس روش تئودورو و همکاران (۱۹۹٤) استفاده شد. به صورت خلاصه ٥۰۰ میلی‌گرم از جیره‌های کاملاً مخلوط آسیاب شده با الک ۱ میلی- متری در فلاسک‌های شیشه‌ای مخصوص با حجم ۱۲۰ میلی‌لیتر ریخته شده و پس از افزودن ٦۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و بافر با استفاده از درپوش پلاستیکی پلمپ شده و فرایند انکوباسیون با استفاده از سیستم اتوماتیک تولید گاز (گل پونه صفاهان، اصفهان، ایران) در دو اجرا دوره اتکوباسیون مجزا و ۳ تکرار در هر اجرا دوره انجام شد. نمونه‌ی مایع شکمبه از ۳ رأس گاو نر بالغ نژاد هلشتاین فیستولادار و قبل از مصرف وعده غذایی صبح جمع‌آوری و صاف شد و در فلاسک محتوای گاز کربنیک سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. مایع شکمبه پس از انتقال به آزمایشگاه به منظور جدا شدن باکتری‌های متصل به الیاف و اطمینان از حضور همه ریز جانداران شکمبه در محیط کشت، در آغاز با استفاده از مخلوط کن به مدت دو دقیقه مخلوط (بائنو و همکاران ۲۰۰٥) و با استفاده از پارچه توری ٤ لایه صاف و در حمام آبی با دمای ۳۹ درجه سلسیوس، تحت جریان پیوسته CO_2 ، مایع شکمبه و محیط کشت به نسبت یک قسمت مایع شکمبه و دو قسمت محیط کشت به داخل بالن سه دهانه مخصوص ریخته شده و تا زمان انتقال به شیشه‌های حاوی نمونه در دمای ۳۹ درجه سلسیوس و در مجاورت گاز دی اکسید کربن قرار گرفت. به منظور تعیین میزان گوارش پذیری شکمبه‌ای حقیقی ماده خشک در شکمبه ۲٤ ساعت پس از انکوباسیون شکمبه‌ای از فیلتراسیون باقیمانده‌های تخمیر استفاده شد. جمعا ٦ فلاسک مجزا به ازای هر مکمل در هر دوره به منظور تعیین گوارش‌پذیری مواد

مغذی و برای تعیین فراسنجه‌های شکمبه‌ای به همراه ۳ فلاسک به عنوان بلانک برای تصحیح بیوماس میکروبی اختصاص یافت. در تعیین گوارش پذیری مواد داخل فلاسک‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن ٤١ بدون خاکستر جدا شده و به مدت ٤٨ ساعت در آون ٦٠ درجه سلسیوس برای تعیین میزان ماده خشک قرار گرفت. برای تعیین اثر مکمل سازی با مخمر بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، محتویات فلاسک‌ها با استفاده از توری ٤ لایه صاف شده اندازه‌گیری pH نمونه‌ها با استفاده از دستگاه pH سنج (Schott Titrator Titrolineeasy) اندازه‌گیری شد. محتویات فلاسک‌ها به منظور اندازه‌گیری VFA و نیتروژن آمونیاکی با اسید سولفوریک ۵۰ درصد (نسبت ۱ به ۵۰ به مایع شکمبه) محافظت شده تثبیت شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در زمان اندازه‌گیری، محتوای فلاسک‌ها یخ گشایی شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سه نمونه ۱ میلی‌لیتری از هر فلاسک برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی و غلظت لاکتات، برداشت شد. از کروماتوگرافی گازی (6820 Agilent Gas Chromatograph, Agilent Technologies, Santa Clara, United States) و ستون موئین (J&W HP- FFAP GC Column, HP-FFAP 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm, 7-inch cage, Agilent). برای تعیین الگوی اسیدهای چرب فرار به روش صاحبی و همکاران (۲۰۲۱) استفاده شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی با روش نورسنجی بر اساس روش کنگ و برودریچ (۱۹۸۰) تعیین شد. برای تعیین غلظت لاکتیک اسید در نمونه‌های مایع شکمبه صاف و سانتریفیوژ شده از کیت و استاندارد آزمایشگاهی لاکتات شرکت بیورکس فارس (Cat No BXS0622) استفاده شد. برای تعیین میزان فعالیت اندوتوکسینی لیپو پلی ساکاریدی LPS در مایع شکمبه از کیت Limulus amebocyte lysate (LAL) به روش توربیدومتریک سینتیک و دستگاه اتوانالایزر (autoanalyzer, BT_1500, Biotecnica Instruments, Rome, Italy) استفاده شد Bioendo, Fujian, China Bioendo KT Endotoxin) Test Kit Kinetic Turbidimetric Assay). به منظور آماده سازی مایع شکمبه پس از فیلتراسیون به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۱ هزار g سانتریفیوژ شده و مایع رویی برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفت (اوگاتا و همکاران ۲۰۱۹). برای برآورد فراسنجه‌های تولید گاز (بخش بالقوه قابل تجزیه (b)، نرخ تولید گاز (c) و فاز تأخیر (lag time))، داده‌های تولید گاز با استفاده از رویه‌ی NLIN نرم افزار SAS و مدل Mitscherlich پیشنهاد شده توسط فرانک و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد.

$$GP = A\ (1 - e^{-c\ (T - L)})$$

میزان راندمان تولید گاز به صورت حجم گاز تولیدی (میلی‌لیتر گاز در گرم ماده خشک) پس از ٢٤ ساعت از انکوباسیون تقسیم‌بر تجزیه‌پذیری ماده خشک (گرم) از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

Gas yield (GY_{24}) = mL gas g DM /g DMD

انرژی قابل متابولیسم (برحسب مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) و گوارش‌پذیری برون‌تنی ماده آلی (برحسب گرم در ۱۰۰ گرم ماده آلی) به روش منک و همکاران (۱۹۷۹) به ترتیب از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

ME=2.20+0.136 GP (mL/0.5 g DM) +0.057 CP (g/kg DM)

OMD=148.8+08.89GP+4.5CP (g/kgDM)+0.651ash (g/kgDM)

استخراج DNA ژنومی و ارزیابی جمعیت میکروبی با استفاده از سیستم RT-qPCR

این بخش از آزمون در آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام شد. بخشی از مایع شکمبهٔ صاف‌شده، به منظور استخراج ژنومی به مخزن با دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس انتقال یافت. استخراج DNA بر پایه روش تاجیما و همکاران (۲۰۰۱) و یانگ

و همکاران (۲۰۰۹) با اندکی تغییرات به شرح زیر انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع شکمبه با ۱ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد CATB به همراه ۱ گرم گلوله سرامیکی با قطر میانگین ۱۰۰- ۵۰ µm مخلوط و به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در هموژنایزر قرار گرفت. در نهایت کل مقادیر محلول مربوط به هر نمونه با هم مخلوط شده و به مدت ده دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به ظرف جدید انتقال یافته و با استفاده از فنول و کلروفرم استخراج شد. پس از سانتریفیوژ دوباره، مواد ژنتیکی با استفاده از اتانول مطلق سرد به میزان دو برابر حجمی به مدت دو ساعت در یخ قرار گرفت و به منظور رسوب DNA به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق به‌روش یانگ و همکاران (۲۰۰۹) سانتریفیوژ شد. مواد رسوب داده شده با اتانول ۷۰ درصد شسته و پس از خشک شدن نسبی تحت خلأ، در محلول بافر-Tris EDTA سترون حل و با استفاده از DNase-free and RNase (AT1) فرآوری شده و با استفاده از سامانهٔ خالص سازی فرآوری و با استفاده از بافر مخصوص پالایه شد. در نهایت DNA خالص شده به منظور تعیین غلظت و کیفیت با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری اسپکتروفتومتر نانو درآپ (Thermo Scientific) ارزیابی و تا زمان استفاده بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

آغازگر (پرایمر) های مورد استفاده و مشخصات آن‌ها برای هرکدام از گروه‌ها و گونه‌های میکروبی در جدول ۲ نشان داده شده است. آغازگرهای مورد استفاده توسط شرکت پیشگام ساخته شده و به منظور اطمینان از توالی آغازگر، همه‌ی آغازگرها توالی یابی شدند. به منظور بررسی اختصاصی بودن آغازگرها، DNA استخراج شده با استفاده از سامانه‌ی (Applied PCR Biosystems 2720 Thermal Cycler) تکثیر شدند. جدول ۲، نشان‌دهنده‌ی الگوی نوکلئوتیدی مورداستفاده در ارزیابی جمعیت میکروارگانیسمی است. هر ۲۵ میکرولیتر مخلوط PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR دارای ۱۰×۲۲ mM MgCl، 15 پیکومول از هر کدام از آغازگرها، ۱ میکرولیتر dNTP’s شامل ۵۰ میکرومول از هر کدام از داکسی - نوکلئوزید تری فسفات‌ها، ۲/۵ واحد TaqTM DNA polymeraseو آب درجه خلوص PCR داشت.

Table 1. Dietary composition of the experimental TMR diets with different concentrate content

Dietary ingredients	TMR 60%	TMR 70%
Alfalfa hay	220	220
Corn silage	180	80
Dried beet pulp	40	40
Corn grain	130	180
Barley grain	130	180
Wheat grain	40	40
Soybean meal	110	110
Canola meal	70	70
Corn gluten meal	30	30
Ca carbonate	10	10
MgO	4	4
Salt	10	10
Sodium bicarbonate	10	10
Di-calcium-phosphate	6	6
Min/Vit supplement	10	10
Sum	1000	1000
Chemical composition		
DM	60	60
NEl (Mcal/kg DM)	1.6	1.8
CP	18	18
NDF	33	28
NFC	38	44
Total Fat	2.4	2.4
Ca	1	1
P	0.6	0.6

برنامه‌ی دمایی (simplified hot start) شامل ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه به‌منظور فعال‌سازی آنزیم، ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه به منظور واسرشت سازی اولیه و ٤٠ دور شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه واسرشت سازی، ۳۰ ثانیه برای اتصال (بر پایهٔ دمای اتصال گزارش شده در جدول ۲) و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌منظور بسط در نظر گرفته شد. در نهایت دما به مدت ٦ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس حفظ شد و پس از آن در ٤ درجه سلسیوس قرار گرفت. محصولات PCR با استفاده از ژل ۲ درصد آگارز و MeduriGreen با استفاده از سامانه الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت جدا شد و با استفاده از سامانه کیت استخراج DNA از ژل استخراج شده و به منظور اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرها در افزایش، توالی یابی شدند. رقت‌های مختلف محصولات PCR استخراج شده از ژل و DNA استخراج شده به منظور کارایی در سامانه‌ی RT-qPCR استفاده شدند.

RT-qPCR

افزایش DNA با استفاده از سامانه (Applied System Biosystems® 7500 Real-Time PCR) و با سه تکرار برای هرکدام از جفت آغازگرهای مورد بررسی انجام شد. افزون بر این در هر دور از نمونه‌های حاصل از مخلوط DNA حاصل از تیمارهای مختلف در غلظت‌های مختلف به عنوان کالیبراتورهای بین دور استفاده شد. در هر دور افزون بر نمونه‌های مورد ارزیابی و کالیبراتورهای مورد اشاره از سه تکرار NTC (Non-Template-Control) به منظور اطمینان از اختصاصی بودن واکنش‌ها استفاده شد. به منظور افزایش نمونه‌های DNA از سامانه (SYBR Dynamo, Thermo Fischer, green master mix Scientific) استفاده شد. هر ۲۰ میکرولیتر مخلوط PCR شامل ۲ میکرولیتر

مخلوط آغازگر (٤ پیکومول بر میکرولیتر از هر آغازگر)، ٤ میکرولیتر آب با درجه خلوص PCR، ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR Mix و ٤ میکرولیتر از محلول حاوی DNA بود. برنامه‌ی دمایی مورداستفاده شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه برای واسرشت سازی اولیه و چهل دور شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۳-٦۲ درجه سلسیوس برای اتصال و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور بسط در نظر گرفته شد. منحنی‌های مربوط به Melting curves با افزایش دما به میزان ۰/۱ درجه سلسیوس در ثانیه از ۵۵ به ۹۵ درجه سلسیوس با اندازه‌گیری مقادیر فلورسانس در هر ثانیه به دست آمد. این منحنی‌ها به‌منظور ارزیابی کیفیت و اختصاصی بودن فرآیند افزایش استفاده شد. جمعیت گروه‌های مختلف باکترهای شکمبه به صورت نسبی از جمعیت کل باکتری‌های شکمبه تعیین شد (Total rumen bacterial 16S rDNA at 24 h). بر این پایه جمعیت نسبی گروه‌های مختلف بر پایه مقادیر delta Ct (Ct باکتری مورد بررسی منهای Ct کل باکتری‌ها) و بر پایه معادله $2e^{-deltaCt}$ محاسبه شد (دنمن و مک اسونی ۲۰۰٦). میزان تغییرات در جمعیت گروه‌های مختلف میکروارگانیسم‌های شکمبه در نتیجه افزودن انواع مختلف منابع روغنی بر پایه جمعیت گروه میکروبی مورد نظر نسبت به گروه شاهد بررسی شد. برای این منظور جمعیت میکروبی در هر گروه در تیمار شاهد برابر با ۱۰۰ در نظر گرفته شد و میزان تغییرات در هر کدام از گروه‌های میکروبی نسبت به گروه شاهد برآورده شد.

تجزیه تحلیل آماری

داده‌های مربوط به فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای همانند فراسنجه‌های تولید گاز، مقدار و الگوی اسیدهای چرب و متابولیت‌های شکمبه‌ای همانند لاکتات و LPS، گوارش‌پذیری مواد مغذی و فراوانی نسبی میکروارگانیسم‌های شکمبه، در قالب آزمون چندعاملی ٤×۲ (٤ سطح مختلف مکمل و ۲ نوع جیره TMR با سطوح متفاوت کنسانتره) با استفاده از رویه Mixed نرم‌افزار آماری SAS (۹/۱) مورد ارزیابی قرار گرفتند ($Y_{ij}=\mu+Y_i+C_{j+}\ YC_{ij}+e_{ij}$). در ارتباط با داده‌های کینتیک تولید تجمعی گاز از روش آنالیز داده‌های تکرار شده در زمان استفاده شده و اثر زمان انکوباسیون (ساعت) به عنوان عامل تکرار شونده و اثر متقابل زمان انکوباسیون، سطح کنسانتره و سطح مخمر در مدل آماری قرار گرفت ($Y_i+C_{j+}+It_k+YC_{ij}+YIt_{ik+}\ YCIt_{ijk+}$ $Y_{ijk}=\mu+e_{ijk}$). در آنالیز آماری با روش داده‌های تکرار شده در زمان، با توجه به داده‌های خروجی، ساختار کوواریانس نوع اول (autoregressive First order) به عنوان بهترین ساختار مورداستفاده قرار گرفت. در مدل‌های آماری فوق μ: میانگین جامعه؛ Y_i: اثر سطح مخمر؛ C_j اثر سطح کنسانتره؛ It_j: اثر زمان انکوباسیون؛ e_{ijk}: اثر اشتباه آزمایشی، در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین حداقل مربعات و خطای استاندارد[1] در جداول مربوطه گزارش‌شده و تصحیح داده‌ها با استفاده از آزمون توکی و مقایسه میانگین‌ها با گزینه PDIFF در سطح احتمال آماری ۹۵ درصد ($P<0/05$) انجام شد.

حروف نمایانگر معنی‌داری در جداول بر اساس معنی‌داری اثر متقابل بین سطح مخمر و سطح کنسانتره جیره تنظیم شده است.

1 Standard Error of Means (SEM)

Table 2. Primer design and characteristics used for PCR amplification of rumen microorganisms

	(FO- Primer)	(RE – Primer)	Ann. Temp.	Reference
Total bacteria	GTG STG CAY GGY TGT CGT CA	GAG GAA GGT GKG GAY AC GT	60	Maeda et al. (2003)
Total protozoa	CAYGTCTAAGTATAAATAACTAC	CTCTAGGTGATWWGRTTTAC	61	Sylvester et al. (2004)
Total fungi	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	60	Denman & McSweeney (2006)
F. succinogenes	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCCTGAACTATC	62	Tajima et al. (2001)
R. albus	GTTTTAGGATTGTAAACCTCTGTCTT	CCTAATATCTACGCATTTCACCGC	60	Potu et al. (2011)
R. flavefaciens	TCTGGAAACGGATGGTA	CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA	62	Koike, S. & Kobayashi (2001)
B. fibrisolvens	TAACATGAGTTTGATCCTGGCTC	CGTTACTCACCCGTCCGC	62	Potu et al. (2011)

نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف افزودن مکمل حاوی مخمر ساکارومایسس سرویسیا بر کنتیک تولید گاز در ساعت‌های مختلف پس از انکوباسیون (۲، ٤، ٦، ۸، ۱۲، ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۹٦، ۱۲۰ و ۱٤٤ ساعت) در جیره‌های آزمایشی کاملاً مخلوط در جدول ۳ گزارش شده است.

کنتیک تولید گاز

طبق نتایج جدول افزودن سطوح مختلف مکمل ساکارومایسیس سرویسیا سبب افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) میزان گاز تولیدی با افزایش مدت‌زمان انکوباسیون جیره‌های آزمایشی شده است. نتایج نشان‌دهنده‌ی آن است که بین سطوح مختلف مکمل اختلاف آماری معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) وجود دارد به طوری که در تمام ساعات انکوباسیون بیشترین میزان گاز تولیدی در جیره‌های آزمایشی در سطح ۱۲ میلی‌گرم بر گرم مکمل مشاهده شد. اثر جیره نیز از ساعت ٤۸ پس از انکوباسیون تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) داشت. بیشترین میزان تولید گاز در ساعت‌های مختلف انکوباسیون را جیره حاوی ٦۰ درصد کنسانتره داشت. همچنین اثر متقابل نوع جیره و سطوح مکمل نیز تأثیر معنی‌داری تا ساعت ٤۸ پس از انکوباسیون و ساعت‌های ۱۲۲ و ۱٤٤ مشاهده شد طبق نتایج به‌دست‌آمده بهبود تولید گاز را درنتیجه افزودن مخمر نشان داده است. پیش از این، افزایش تولید گاز با افزودن مخمر در بسیاری از مطالعات گزارش‌شده است (تانگ و همکاران ۲۰۰۸؛ الغاندور و همکاران ۲۰۱٤). این ممکن است ناشی از افزایش تولید اسید چرب پروپیونات به دلیل بهبود تخمیر شکمبه باشد. زیرا دی اکسید کربن هنگام تولید پروپیونات توسط برخی از باکتری‌های شکمبه از طریق مسیر سوکسینات ـ پروپیونات تولید می‌شود (ولین و میلر ۱۹۹۸). تخمیر کربوهیدرات‌های جیره‌ای به اسیدهای چرب فرار باعث تولید گازهایی در شکمبه می‌شود که به طور عمده هیدروژن، دی اکسید کربن و متان را تشکیل می‌دهند، افزودن مخمر نه تنها توانایی بهبود تولید گاز را دارد، بلکه می‌تواند تغییرات کیفی در گازهای تولید شده ایجاد کند و تأثیر منفی بر محیط را کاهش دهد (هریستو و همکاران ۲۰۱۳). تولید گاز بهبود یافته با عصاره مخمر نسبت به مخمر زنده منعکس کننده محیط انکوباسیون پیشرفته است. تعدادی از مکانیسم‌های خاص بیوشیمیایی فرضی برای توضیح اثرات تحریکی مخمر در تخمیر شکمبه ایجاد شده است (چوائوکس و فابر ۲۰۰۷). برخی از این مکانیسم‌ها بر اساس توانایی عصاره مخمر به دلیل شرایط اسیدی موجود در دستگاه گوارش و روده بدون تغییر باقی بماند که ممکن است فعالیت بیولوژیکی محصول را در طیف وسیعی از گونه‌ها به خود اختصاص دهد. علاوه بر این، توانایی مخمر برای دفع اکسیژن اضافی از شکمبه، فضای بهتری را برای باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه ایجاد می‌کند (نیوبلد و همکاران ۱۹۹٦؛ جووانی ۲۰۰۱). مطالعات دیگر حاکی از آن است که مخمر می‌تواند محلی برای تبادل متابولیک و محیطی مناسب برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های مفید را در اطراف بسترها فراهم کند (جووانی ۲۰۰۱).

Table 3. Effects of yeast supplementation on cumulative gas production kinetics in total mixed diet

		Cumulative Gas production (ml/g DM)										
	Doses	2	4	6	8	12	24	48	72	96	120	144
TMR	0	2.99^{b}	9.27^{c}	13.78^{c}	16.20^{c}	23.54^{c}	57.77^{c}	150.28^{e}	245.66^{e}	336.77^{d}	425.16^{e}	489.82^{f}
60%	4	4.81^{a}	12.77^{b}	19.32^{ab}	23.14^{ab}	32.91^{b}	73.36^{ab}	167.52^{d}	264.09^{d}	356.48^{c}	443.52^{e}	507.26^{e}
	8	3.65^{ab}	10.80^{bc}	15.83^{bc}	18.35^{bc}	26.14^{bc}	63.02^{c}	163.82^{d}	273.93^{c}	376.65^{c}	475.64^{d}	547.84^{d}
	12	5.33^{a}	14.26^{a}	21.49^{a}	25.45^{a}	36.21^{a}	80.95^{a}	187.15^{b}	297.33^{b}	408.57^{b}	509.42^{bc}	583.04^{c}
TMR	0	3.65^{ab}	10.80^{bc}	15.83^{bc}	18.35^{bc}	26.14^{bc}	63.02^{c}	163.82^{d}	273.96^{c}	376.65^{c}	475.64^{d}	547.84^{d}
70%	4	4.39^{a}	12.41^{b}	18.43^{b}	21.61^{b}	30.90^{b}	71.52^{ab}	177.74^{c}	294.10^{b}	400.92^{b}	503.57^{c}	580.18^{c}
	8	3.17^{b}	10.61^{bc}	15.77^{bc}	18.93^{bc}	28.02^{b}	71.30^{ab}	185.69^{b}	301.59^{b}	411.63^{b}	519.46^{b}	598.70^{b}
	12	3.55^{ab}	12.11^{b}	17.85^{b}	21.48^{b}	31.41^{b}	78.63^{a}	204.66^{a}	331.71^{a}	452.10^{a}	570.42^{a}	657.50^{a}
SEM		0.327	0.579	0.937	1.20	1.60	2.46	2.14	2.10	2.57	2.96	3.44
Pvalues		0.0311	0.4765	0.3392	0.4176	0.6075	0.1805	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
TMR		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Yeast Dose												
TMR*Dose												

Table 4. Effects of yeast Supplementation on rumen fermentation parameters in TMR diets

	Doses	Total VFA (mMol/l)	Acetate (ml/100ml)	Propionate (ml/100ml)	Butyrate (ml/100ml)	Valerate (ml/100ml)	Iso Butyrate (ml/100ml)	Iso Valerate (ml/100ml)	pH	N-NH_3 (mg/dl)	Lactic Acid (g/l)	LPS[1] activity (×103 EU/ml)
TMR	0	104.25^{f}	59.40^{ab}	27.05^{a}	7.10	5.35	0.50	0.60	5.93^{f}	13.99^{a}	0.164^{b}	3.16^{b}
60%	4	115.74^{d}	60.05^{a}	26.87^{ab}	6.48	5.48	0.43	0.69	6.11^{d}	13.84^{b}	0.117^{c}	2.07^{cd}
	8	124.50^{c}	60.42^{a}	26.46^{ab}	5.86	6.03	0.46	0.78	6.38^{b}	13.76^{bc}	0.053^{d}	1.18^{e}
	12	131.99^{b}	61.13^{a}	25.62^{b}	7.17	5.04	0.42	0.62	6.41^{a}	13.67^{c}	0.026^{e}	0.342^{f}
TMR	0	110.80^{e}	57.11^{b}	28.68^{a}	7.31	5.72	0.48	0.71	5.86^{g}	12.38^{d}	0.186^{a}	5.27^{a}
70%	4	122.30^{c}	57.56^{b}	28.34^{a}	7.08	5.76	0.47	0.79	6.02^{e}	12.15^{e}	0.121^{c}	2.65^{bc}
	8	130.81^{b}	59.15^{ab}	27.67^{ab}	6.89	5.03	0.50	0.76	6.23^{c}	12.03^{f}	0.059^{d}	1.74^{de}
	12	141.05^{a}	60.86^{a}	26.59^{ab}	7.06	4.40	0.44	0.66	6.39^{b}	11.71^{g}	0.028^{e}	0.472^{f}
SEM		0.665	1.113	0.844	0.590	0.452	0.048	0.05	0.0073	0.0247	0.023	0.166
Pvalues		<.0001	0.0389	0.0144	0.1349	0.7127	0.1100	0.0043	<0.0001	<0.0001	<0.035	<0.0125
TMR		<.0001	<0.0001	0.0021	0.0529	0.0057	0.2362	0.0416	<0.0001	<0.0001	<0.002	<0.001
Yeast Dose		0.1698	0.8649	0.9389	0.7959	0.1949	0.7039	0.1565	0.0217	<0.0001	<0.061	<0.001
TMR*Dose												

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

0.0043	0.0211	0.0277	0.0681	0.0778	0.0829	0.0460	0.3800	0.2497	0.0121	0.0013

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

تغییرات فراسنجه های شکمبه‌ای

تأثیر افزودن سطوح مختلف مکمل حاوی مخمر ساکارومایسس سرویسیا بر فراسنجه‌های مختلف شکمبه‌ای در جیره‌های آزمایشی کاملاً مخلوط (٦٠ و ٧٠ درصد کنسانتره) در جدول ٤ گزارش‌شده است.

تولید اسیدهای چرب فرار

طبق نتایج جدول افزودن سطوح مختلف مکمل ساکارومایسیس سرویسیا سبب افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) میزان کل اسیدهای چرب فرار تولیدی در شکمبه با افزایش سطح مصرفی مکمل در جیره‌های آزمایشی شده است. نتایج نشان‌دهنده‌ی آن است که بین سطوح مختلف مکمل اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵) وجود دارد به طوری که بیشترین میزان کل اسیدهای چرب فرار تولیدی در هر دو جیره در سطح ۱۲ میلی‌گرم بر گرم مکمل مشاهده شد. اثر نوع جیره نیز تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت. بیشترین میزان تولید کل اسیدهای چرب فرار را جیره حاوی ۷۰ درصد کنسانتره داشت. میزان استات و پروپیونات با افزایش سطح مکمل مصرفی به ترتیب افزایش و کاهش یافت. اثر جیره و اثر سطوح مکمل اختلاف معنی‌داری نشان داد.

pH و آمونیاک تولیدی

تأثیر افزودن سطوح مختلف مکمل ساکارومایسیس سرویسیا بر روی پارامترهای شکمبه‌ای سبب افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) میزان pH شکمبه و کاهش میزان آمونیاک تولیدی در شکمبه با افزایش سطح مصرفی مکمل در جیره‌های آزمایشی شده است. نتایج نشان-دهنده‌ی آن است که بین سطوح مختلف مکمل اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵) وجود دارد به طوری که بیشترین میزان افزایش pH شکمبه و کاهش میزان آمونیاک تولیدی در جیره‌های آزمایشی در سطح ۱۲ میلی‌گرم بر گرم مکمل مشاهده شد. اثر نوع جیره نیز تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت. بیشترین میزان افزایش pH شکمبه و کاهش میزان آمونیاک تولیدی در جیره حاوی ٦٠ درصد کنسانتره مشاهده شد. همچنین اثر متقابل نوع جیره و سطوح مکمل نیز تأثیر معنی‌داری مشاهده شد.

لاکتیک اسید و LSP

میزان لاکتیک اسید و لیپوپلی‌ساکاریدهای تولیدی در شکمبه با افزایش سطح مصرفی مکمل در جیره‌های آزمایشی کاهش یافت. نتایج نشان‌دهنده‌ی آن است که بین سطوح مختلف مکمل اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵) وجود دارد به طوری که بیشترین میزان کاهش لاکتیک اسید و لیپو پلی ساکاریدها در جیره‌های آزمایشی در سطح ۱۲ میلی‌گرم بر گرم مکمل مشاهده شد. اثر نوع جیره نیز تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت. بیشترین کاهش در جیره حاوی ۷۰ درصد کنسانتره مشاهده شد. همچنین اثر متقابل نوع جیره و سطوح مکمل نیز تأثیر معنی‌داری مشاهده شد. از نتایج به دست آمده، پس از افزودن ساکارومایسس سرویسیا به جیره، علاوه بر افزایش تولید گاز، زمان تأخیر کاهش یافت. این پدیده بر اساس دو مکانیسم اساسی نشان داده شده است (الغاندور و همکاران ٢٠١٤). اولین حالت عمل مخمر توسط (نیوبلد و همکاران ٢٠١٤) گزارش شده است. در واقع فعالیت تنفسی مخمر، اکسیژن محیط شکمبه را از بین می‌برد که این حالت برای باکتری‌های بی‌هوازی سمی است و باعث مهار چسبندگی باکتری‌های سلولایتیک به سلولز می‌شود و این اوج غلظت اکسیژن تقریباً در زمان تغذیه (به‌عنوان‌مثال زمان اولیه) اتفاق می‌افتد. روش دوم این است که مخمر حاوی پپتیدهای کوچک و مواد مغذی است که برای شروع رشد میکروبی به باکتری‌های سلولایتیک شکمبه مورد نیاز است (کلاوی و مارتین، ١٩٩٧). آندو و همکاران (٢٠٠٤) اظهار داشتند که تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی با افزودن مخمر و عصاره مخمر به گندم ایتالیایی و ذرت کامل افزایش می‌یابد. با این حال، با وجود عدم تغییر در pH شکمبه، مقادیر افزایش تولید گاز در شرایط افزودن مخمر بیشتر از

افزودن عصاره‌ی مخمر گزارش شده است. در چندین مطالعه نشان داده شده که مخمر ساکارومایسس سرویسیا با افزایش استفاده از لاکتات، pH شکمبه را تعدیل می‌کند، pH نسبتاً پایدارتری ایجاد می‌کند و نیازهای میکروب‌های شکمبه را برای انجام فعالیت‌هایشان برآورده می‌کند (چائوچیراس ـ دوراند و همکاران ۲۰۰۸؛ الغاندور و همکاران ۲۰۱٤). مخمر می‌تواند رشد و فعالیت بی‌هوازی‌های کل شکمبه و باکتری‌های سلولزی را تحریک کند (جوناری ۲۰۰۱؛ گیراد ۱۹۹٦). طبق نظر گیراد (۱۹۹٦) ساکارومایسس سروسیا می‌تواند تعداد کل میکروارگانیسم‌های شکمبه را افزایش دهد، هضم الیاف را بهبود بخشد، تجمع لاکتات را کاهش دهد، غلظت اکسیژن را در مایع شکمبه کاهش دهد تا باعث بهبود استفاده از جیره غذایی شود. محققان از افزایش میزان هضم سلولز توسط (Fibrobacter succinogenes)، (Ruminococcus flavifaciens) و (Selenomonas ruminantium) در پاسخ به مکمل مخمر خبر داده‌اند (کلاوی و مارتین ۱۹۹۷؛ سولیوان و مارتین ۱۹۹۹).

پارامترهای تولید گاز

تأثیر افزودن سطوح مختلف مکمل حاوی مخمر ساکارومایسس سرویسیا بر فراسنجه‌های تخمیری تولید گاز در جیره‌های آزمایشی کاملاً مخلوط (٦۰ و ۷۰ درصد کنسانتره) در جدول ٥ گزارش‌شده است.

بخش بالقوه قابل‌هضم، نرخ تولید گاز و فاز تأخیر

طبق نتایج جدول افزودن سطوح مختلف مکمل ساکارومایسیس سرویسیا سبب افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰٥$) میزان بخش بالقوه قابل هضم، کاهش نرخ تولید گاز و کاهش فاز تأخیر با افزایش سطح مصرفی مکمل در جیره‌های مختلف شده است. نتایج نشان‌دهنده‌ی آن است که بین سطوح مختلف مکمل اختلاف آماری معنی‌داری ($P<۰/۰٥$) وجود دارد به طوری که بیشترین میزان افزایش بخش بالقوه قابل هضم و کاهش نرخ تولید گاز و فاز تأخیر در جیره‌های مختلف در سطح ۱۲ میلی‌گرم بر گرم مکمل مشاهده شد. اثر جیره نیز تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰٥$) داشت. در بین جیره‌های مختلف در رابطه با افزایش بخش بالقوه گوارش پذیر، جیره ۷۰ درصد بیشترین میزان بخش بالقوه قابل‌هضم و کمترین میزان نرخ تولید گاز و فاز تأخیر را داشت. همچنین اثر متقابل نوع جیره و سطوح مکمل نیز معنی‌دار بود.

تغییرات جمعیت نسبی میکروارگانیسم‌های شکمبه

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد، شکل ۱، نشان دهنده اثر افزودن سطوح مختلف مخمر ساکارومایسس سرویسیا بر جمعیت نسبی پروتوزوآ، قارچ‌های بی‌هوازی و میکروارگانیسم‌های مهم تجزیه‌کننده الیاف در شکمبه است. افزودن سطوح مختلف مخمر در جیره‌های پرکنسانتره سبب افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده الیاف نسبت به گروه شاهد و بدون افزودن مخمر شد. همچنین مخمر، سبب افزایش جمعیت قارچ‌های شکمبه و افزایش جمعیت پروتوزوآ شد (شکل ۱)، که ممکن است هضم الیاف را بهبود بخشد (چائوچیراس و همکاران ۱۹۹٥). آندو و همکاران (۲۰۰٤) دریافتند که، در گراس ایتالیایی، ذرت کامل و کاه برنج ، مقادیر گوارش‌پذیری الیاف بالاتری برای نمونه‌های انکوبه شده با عصاره مخمر مشاهده شد. افزودن سطوح مختلف مخمر ساکارومایسس سرویسیا در هر دو جیره مورد آزمایش، علاوه برافزایش معنی‌دار در میزان گاز تولیدی و بهبود pH، کاهش تجمع لاکتات و کاهش غلظت لیپوپلی ساکاریدهای باکتریایی در شکمبه شد (پنگ و همکاران ۲۰۲۰).

تغییرات ME، Gy_{24} و فراسنجه‌های گوارش‌پذیری

تأثیر افزودن سطوح مختلف مکمل ساکارومایسیس سرویسیا بر فراسنجه‌های تولید گاز سبب افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰٥$) گوارش پذیری ماده آلی، گوارش‌پذیری ماده خشک و گوارش پذیری الیاف نامحلول در شوینده‌ی خنثی با افزایش سطح مصرفی مکمل شده است. نتایج نشان‌دهنده‌ی آن است که بین سطوح

مختلف مکمل اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵) وجود دارد به‌طوری که بیشترین میزان گوارش پذیری ماده آلی، گوارش‌پذیری ماده خشک و گوارش پذیری الیاف نامحلول در شوینده خنثی در جیره‌ها در سطح ۱۲ میلی‌گرم بر گرم مکمل مشاهده شد. تحت تأثیر سطوح مختلف مکمل میزان راندمان تولید گاز در ٢٤ ساعت پس از انکوباسیون و انرژی قابل متابولیسم نیز افزایش معنی‌داری داشت. در مطالعات قبلی، افزودن ساکارومایسس سرویسیا باعث افزایش تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و انرژِی قابل متابولیسم از جیره‌های علوفه‌ای شد (مائو و همکاران ۲۰۱۳؛ الغاندور و همکاران ٢٠١٤). افزایش تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و انرژِی قابل متابولیسم با فعالیت بالای میکروارگانیسم‌ها در شکمبه ارتباط دارد. ساکارومایسس سرویسیا فاکتورهای رشد را برای رشد میکروبی تولید می‌کند که می‌تواند رشد و فعالیت میکروبی شکمبه را تحریک کند (چیکیوته ۲۰۰۹). علاوه براین، ساکارومایسس سرویسیا توانایی ایجاد شرایط مناسب برای رشد میکروبی را دارد به گونه‌ای که توانایی استفاده از اکسیژن در شکمبه را داشته باشد (موسونی و همکاران ۲۰۰۷). افزایش محتوای پروتئین جیره باعث افزایش تولید گاز می‌شود. با این حال، تخمیر پروتئین در مقایسه با تخمیر کربوهیدرات، تولید گاز نسبتاً کمی ایجاد می‌کند (ماکار و همکاران ۱۹۹۵). میزان تولید گاز، عمدتاً به در دسترس بودن مواد مغذی برای میکروارگانیسم‌های شکمبه بستگی دارد (خلیف و همکاران ۲۰۱۵؛ الغاندور). کاملاً واضح است که افزایش تولید گاز در نتیجه افزایش محتوای پروتئین خام بوده است. به خوبی شناخته شده است که ساکارومایسس سرویسیا توانایی کاهش تولید آمونیاک در شکمبه را دارد (هریستو و همکاران ۲۰۱۳). با کاهش تخریب پروتئین و کاهش دفع کلی نیتروژن توسط حیوان، که به کاهش انتشار آمونیاک از کود گاو کمک می‌کند (مائو و همکاران، ۲۰۱۳). نتیجه‌ی مستقیم این عمل افزایش پروتئین عبوری در شکمبه است که به‌عنوان یک پروتئین حقیقی در دستگاه گوارش و روده‌ی کوچک جذب و متابولیزه می‌شود. کاهش زمان فاز تأخیر با افزایش محتوای پروتئین (به‌عنوان‌مثال جیره با پروتئین خام بالاتر) فعالیت سریع ساکارومایسس سرویسیا را بر روی فرآیند تخمیر نشان می‌دهد. علاوه براین، ساکارومایسس سرویسیا حاوی پپتیدهای کوچک و سایر مواد مغذی است که برای شروع رشد به باکتری-های سلولایتیک شکمبه غالب احتیاج دارند (کلاوی و مارتین ۱۹۹۷). فعالیت ساکارومایسس سرویسیا به عوامل زیادی بستگی دارد از جمله در دسترس بودن مواد مغذی برای میکروارگانیسم‌های شکمبه، فرآیند تخمیر را تحریک می‌کند (پایا و همکاران ۲۰۰۷). مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند که تحریک تخریب سلولز با افزودن ساکارومایسس سرویسیا با کاهش زمان تأخیر همراه است، که منجر به افزایش نرخ هضم اولیه می‌شود، ولی تأثیر زیادی در افزایش گوارش‌پذیری الیاف توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه نداشته است (ویلیامز و همکاران ۱۹۹۱). تجزیه‌ی مواد مغذی بدون تأثیر بر گوارش‌پذیری الیاف نامحلول در شوینده خنثی و گوارش‌پذیری الیاف نامحلول در شوینده اسیدی با جیره‌های غذایی حاوی پروتئین خام بالاتر، حتی با افزودن ساکارومایسس سرویسیا، گوارش‌پذیری ماده خشک و گوارش‌پذیری ماده آلی بهبودیافته را نشان داد. با این حال، ساکارومایسس سرویسیا فقط بر گوارش‌پذیری ماده خشک تأثیر می‌گذارد. هر دو جیره دارای محتوای پروتئین خام متفاوت بودند. بنابراین، بهبود گوارش‌پذیری ماده خشک و گوارش‌پذیری ماده آلی نتیجه افزایش پروتئین خام بود که باعث بهبود فعالیت خرد در شکمبه شد. این می‌تواند به دلیل افزایش سطح پروتئین باشد که انرژی در دسترس بیشتری فراهم می‌کند و در نتیجه سبب افزایش تجزیه‌پذیری می‌شود (پلی اوراچ و همکاران ٢٠١٤).

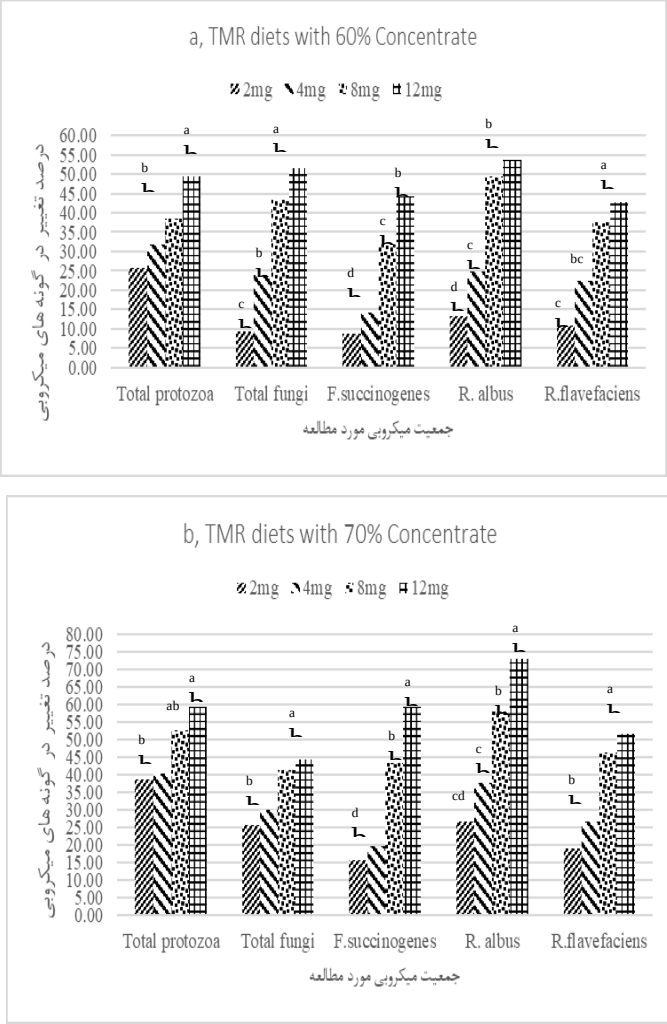

Figure 1. Effect of yeast supplementation on the protozoa, fungi and cellulolytic microorganisms' population in the rumen *in vitro* in diets containing 60 (a) and 70 (b) percent concentrate

SEM was 5.11, 4.12, 3.08, 4.32, and 5.11 for protozoa, fungi, *fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, and *Ruminococcus flavefaciens*, respectively.

The effect of yeast level, diet type and interaction between them in relation to all studied strains was

Table 5. Effects of yeast supplement (Saccharomyces cerevisiae) on gas production parameters and DM and NDF digestibility in TMR

	Doses	b (ml/g DM)	c (ml/h)	Gy_{24} (ml/g DM)	ME MJ/kg (DM)	OMD (g/ 100g OM)	NDFD (g/ 100g DM)	DMD (g/ 100g DM)
TMR 60%	0	317.53^{f}	0.032^{b}	53.20^{d}	7.62^{c}	60.25^{d}	57.63^{dc}	61.78^{d}
	4	329.34^{ef}	0.027^{bc}	70.65^{ba}	7.93^{b}	62.35^{c}	59.25^{b}	64.53^{dc}
	8	334.81^{de}	0.031^{b}	59.37^{dc}	8.07^{ab}	64.54^{ba}	59.98^{ba}	66.97^{cb}
	12	355.64^{c}	0.018^{c}	76.19^{a}	8.19^{a}	66.21^{a}	61.86^{a}	67.66^{ba}
TMR 70%	0	328.51^{d}	0.050^{a}	59.36^{dc}	6.84^{e}	63.73^{cb}	53.10^{d}	65.11^{c}
	4	363.97^{c}	0.040^{ab}	68.88^{cb}	6.96^{e}	62.95^{c}	57.17^{dc}	64.53^{dc}
	8	391.15^{b}	0.026^{bc}	68.61^{b}	7.22^{d}	64.12^{b}	58.65^{cb}	66.97^{cb}
	12	408.80^{a}	0.017^{c}	74.24^{a}	7.35^{d}	63.40^{cb}	59.43^{ba}	67.66^{ba}
SEM		3.043	0.0032	0. 001	0.043	0.011	0.633	1.46
Pvalues								
TMR		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Yeast Dose		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
TMR*Dose		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0166

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

بانچ و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که مهم‌ترین عوامل مؤثر بر استفاده از پروتئین خوراکی در شکمبه شامل نوع پروتئین، کربوهیدرات و فعل و انفعالات آن‌ها و جمعیت میکروبی غالب در شکمبه است. میزان گوارش‌پذیری الیاف نامحلول در شوینده خنثی و گوارش‌پذیری الیاف نامحلول در شوینده اسیدی با تغییر محتوای پروتئین بدون تغییر بود. با این حال، با افزودن ساکارومایسس سرویسیا میزان گوارش-پذیری الیاف نامحلول در شوینده‌ی خنثی و گوارش-پذیری الیاف نامحلول در شوینده‌ی اسیدی افزایش یافت که ممکن است به دلیل پروتئین بالای جیره باشد. کاملاً شناخته شده که ساکارومایسس سرویسیا توانایی تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه را دارد (جوانی ۲۰۰۱). در مطالعه‌ای نشان دادند که ساکارومایسس سرویسیا می‌تواند تعداد کل میکروارگانیسم‌های شکمبه را افزایش دهد و استفاده از خوراک را بهبود بخشد (پلی اوراچ و همکاران ۲۰۱٤). با این حال، بیشتر گزارش‌ها بهبود تجزیه‌پذیری بخش‌های مختلف الیاف را نشان می‌دهند. انرژی قابل متابولیسم، پروتئین میکروبی و تولید گاز در ۲٤ ساعت بهبود یافته با جیره دارای پروتئین خام بالا مشاهده شد. جیره‌هایی با محتوای پروتئین بالا، مواد مغذی لازم برای فعالیت آن را در شکمبه تأمین می‌کنند که در نهایت سبب بهبود تولید گاز، سنتز پروتئین میکروبی بالاتر و تجزیه‌پذیری بیشتر تأثیر می‌گذارد. این را می‌توان برای تأثیر افزودن ساکارومایسس سرویسیا بر فعالیت تخمیر تعمیم داد. در مطالعاتی نشان دادند که افزودن ساکارومایسس سرویسیا باعث افزایش میزان انرژی قابل متابولیسم می‌شود. آن‌ها نتایج خود را به فعالیت-های بالای میکروب‌ها در شکمبه در نتیجه عوامل رشد تولید شده برای رشد و فعالیت میکروبی در شکمبه و توانایی ساکارومایسس سرویسیا برای ایجاد شرایط بی‌هوازی مساعد برای رشد میکروبی، برگرداند (مائو و همکاران ۲۰۱۳ و الغاندور و همکاران ۲۰۱٤). جیره‌های دارای پروتئین خام بالا سبب افزایش تولید گاز و کاهش تولید متان در مقابل جیره‌ی کم پروتئین شد. علاوه براین، ساکارومایسس سرویسیا با کاهش متان، کینتیک تخمیر شکمبه را بهبود می‌بخشید (موسونی و همکاران ۲۰۰۷).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که افزودن سطوح مختلف مکمل ساکارومایسیس سرویسیا به طور مؤثری سبب افزایش میزان گاز تولیدی در جیره‌های کاملاً مخلوط شده و با این حال، با مکانیسم‌های مختلفی همانند تحریک افزایش مصرف اسیدلاکتیک از افت شدید pH جلوگیری نموده و با بهبود شرایط تخمیر در جیره‌های حاوی مقادیر بالای کنسانتره و کربوهیدرات‌های قابل تخمیر، زمینه‌ی افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های دخیل در فرایند تجزیه‌ی الیاف را فراهم نموده و سبب افزایش گوارش‌پذیری شکمبه‌ای الیاف می‌شوند. با این حال پیشنهاد می‌شود این آزمایش در شرایط درون‌تنی و مخصوصاً با استفاده از حیوانات فیستولادار تکرار شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه و شرکت دانش‌بنیان تک ژن زیست بابت تأمین بخشی از هزینه‌های پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

Abdulmumini BA and Shengyong M. 2021. Influence of yeast on rumen fermentation, growth performance and quality of products in ruminants: A review, Animal Nutrition 7: 31-41.

Ando S Khan RI Takahasi J Gamo Y Morikawa R Nishiguchi Yand Hayasaka K. 2004. Manipulation of rumen fermentation by yeast: the effect of dried beer yeast on the in vitro degradability of forages and methane production. Asian Australian Journal of Animal Science 17: 68-72.

Bach A Calsamiglia S and Stern MD. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science, 88: 9–21.

Callaway ES and Martin SA. 1997. Effects of a Saccharomyces cerevisiae culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. Journal of Dairy Science 80: 2035–2044.

Chaucheyras F Fonty G Bertin G and Gouet P. 1995. In vitro utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an Archea methanogen is stimulated by a probiotic strain of Saccharomyces cerevisiae. Applied and Environmental Microbiology 61: 3466.

Chaucheyras Durand F Walker ND and Bach A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. Animal Feed Science and Technology 145: 5–26.

Chevaux E Fabre MM. 2007. Probiotic yeast in small ruminants. Feed Mix 15: 28-29.

Chiquette J. 1995. Saccharomyces cerevisiae and Aspergillus oryzae, used alone or in combination as a feed supplement for beef and dairy cattle. Canadian journal of Animal Science 75: 405-415.

DehghanBanadaky M Ebrahimi M Motameny R and Heidari SR. 2012. Effects of live yeast supplementation on mid-lactation dairy cow's performances, milk composition, rumen digestion and plasma metabolites during hot season. Journal of Applied Animal Research 23: 1-6.

Dehority BA. 1979. Ciliate protozoa in the rumen of Brazilian water buffalo, Bubalus bubalis Linnaeus. Journal of Protozoology 26: 536-544.

Denman SE and McSweeney CS. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. FEMS Microbiology Ecology 58: 572–582.

Di Francia A Masucci F DeRosa G Varrichio ML and Proto V. 2008. Effect of Aspergillus oryzae extract and a saccharomyces cerevisiae fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves. Animal Feed Science and Technology 140: 67-77.

Ding J Zhou ZM Ren LP and Meng QX. 2008. Effect of Monensin and live yeast supplementation on growth performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and ruminal fermentation parameters in lambs fed steam-flaked corn-based diets. Asian Australian Journal of Animal Science 21: 547-554.

Elghandour MMY Kholif AE MárquezMolina O VázquezArmijo JF Puniya AK and Salem AZM. 2015. Influence of individual or mixed cellulase and xylanase mixture on in vitro rumen gas production kinetics of total mixed rations with different maize silage and concentrate ratios. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science 39: 435–442.

Elghandour MMY Salem AZM Martínez Castañeda JS Camacho LM Kholif AE and Vázquez Chagoyán JC. 2015. Direct-fed microbes: a tool for improving the utilization of low-quality roughages in ruminants. Journal of Integrated Agriculture. 14: 526–533.

Elghandour MMY Vázquez Chagoyán JC Salem AZM Kholif A E Martínez Castañeda JS Camacho LM and CerrilloSoto MA. 2014. Effects of Saccharomyces cerevisiae at direct addition or pre-incubation on in vitro gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. Italian Journal of Animal Science 13: 295–301.

Fuller R. 1992. Probiotics: the scientific basis. Chapman and Hall. London pp: 1-20.

Girard ID. 1996. Characterization of stimulatory activities from Saccharomyces cerevisiae on the growth and activities of ruminal bacteria. PhD Dissertation., University of Kentucky, Lexington, KY, USA.

Holder V. 2007. The effects of specific Saccharomyces cerevisiae strains and Monensin supplementation on rumen fermentation in vitro. PhD Dissertation pp: 147.

Hossain SA Parnerkar S Haque N Gupta RS Kumar D and Tyagi AK. 2012. Influence of dietary supplementation of live yeast (Saccharomyces cerevisiae) on nutrient utilization ruminal and biochemical profiles of Kankrej calves. Journal of Animal Science 1: 30-38.

Hosseinabadi M DehghanBanadaky M and Zali A. 2018. Comparison the effects of feeding yeast probiotic in milk or starter on growth performance, health, blood and rumen parameters of Holstein calves. Animal Production 20.

Hristov AN Oh J Firkins JL Dijkstra J Kebreab E Waghorn G Makkar HP Adesogan AT Yang W and Lee C. 2013. Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. Journal of Animal Science91: 5045–5069.

Johnston M and Kim JH. 2005. Glucose as a hormone: receptor mediated glucose sensing in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochemical Society Transactions 33: 247-252.

Jouany JP. 2001. A new look to the yeast culture as probiotics for ruminants. Feed Mix 9: 17–19.

Julliand S Martin A and Julliand V. 2018. Effect of live yeast supplementation on gastric ecosystem in horses fed a high-starch diet. Livestock Science 215: 25-29.

Kholif AE Khattab HM El-Shewy AA Salem AZM Kholif AM ElSayed MM Gado HM and Mariezcurrena MD. 2014. Nutrient digestibility, ruminal fermentation activities, serum parameters and milk production and composition of lactating goats fed diets containing rice straw treated with Pleurotus ostreatus. Asian Australian Journal of Animal Science 27: 357–364.

Ko CH Liang H and Gaber RF. 1993. Roles of multiple glucose transporters in Saccharomyces cerevisiae. Molecular Cell Biology 13: 638-648.

Koike S and Kobayashi Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: fibrobacter succinogenes, ruminococcus albus and ruminococcus flavefaciens. FEMS Microbiology Letters 204: 361-366.

Kruckeberg AL and Bisson LF. 1990. The HXT2 gene of saccharomyces cerevisiae is required for high - affinity glucose transporter required. Molecular Cell Biology 10: 5903-5913.

Maeda H Fujimoto C Haruki Y Maeda T Kokeguchi S Petelin M Arai H Tanimoto I Nishimura F and Takashiba S. 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for Actinobacillus actinomycetemcomitans Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, gene and total bacteria. FEMS Immunology and Medical Microbiology 39: 81–86.

Makkar HPS Blümmel M and Becker K. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone's or polyethylene glycols and tannins and their implications in gas production and true digestibility in in vitro techniques. British Journal of Nutrition 73: 897–933.

Mao HL Mao HL Wang JK Liu JX and Yoon I. 2013. Effects of Saccharomyces cerevisiae fermentation product on in vitro fermentation and microbial communities of low-quality forages and mixed diets. Journal of Animal Science 91:3291– 3298.

MillerWebster T Hoover WH Holt M and Nocek JE. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. Journal of Dairy Science 85:2009–2014.

Mosoni P Chaucheyras Durand F BeratMaillet C and Forano E. 2007. Quantification by real time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates. Effect of a yeast additive. Journal of Applied Microbiology 103: 2676–2685.

Newbold CJ Wallace RJ Chen XB and McIntosh FM. 1995. Different strains of Saccharomyces cerevisiae differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. Journal of Animal Science, 73: 1811-1819.

Nikkhah A and Dehghan Banadaky M. 2004. Effects of feeding yeast (saccharomyces cerevisiae) on productive performance of lactating Holstein dairy cow. Iranian Journal of Agricultural Science 35.

Ogata T Kim Y H Masaki T Iwamoto E Ohtani Y Orihashi T Ichijo T and Sato S. 2019. Effects of an increased concentrate diet on rumen pH and the bacterial community in Japanese Black beef cattle at different fattening stages. The Journal of veterinary medical science 81: 968–974.

Olagaray KE Sivinski SE Saylor BA Mamedova LK SaulsHiesterman JA Yoon I and Bradford BJ. 2019. Effect of Saccharomyces cerevisiae fermentation product on feed intake parameters, lactation performance, and metabolism of transition dairy cattle. Journal of Dairy Science 102: 8092–8107.

Patra AK. 2012. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 7: 366-375.

Perez M Luyten K Michel R Riou C and Blondin B. 2005. Analysis of saccharomyces cerevisiae hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high- affinity hexose transporter expressed. FEMS Yeast Research 5: 351-361.

Polyorach S Wanapat M and Cherdthong A. 2014. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using in vitro gas production technique. Asian Australian Journal of Animal Science 27: 36–45.

Potu RB AbuGhazaleh AA Hastings D Jones K and Ibrahim A. 2011. The effect of lipid supplements on ruminal bacteria in continuous culture fermenters varies with the fatty acid composition. Journal of Microbiology 49:216-223.

Pourabbasali N Torbatinejad NM Hasani S and Gharahbash AM. 2007. Study of the effect Saccharomyces cerevisiae yeast on fattening performance and blood metabolites of Atabai lambs. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 14: 21-43

Russell JB. 2002. Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition. Cornell University (Ithaca, NY) Ed 122p.

Strohlein H. 2003. Back to nature. Live yeasts in feed for dairy cows. DMZ, Lebensm Ind Milchwirtsch, 124: 68–71.

Sullivan HM and Martin SA. 1999. Effects of Saccharomyces cerevisiae culture on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. Journal of Dairy Science 82: 2011-2016.

Sylvester JT Karnati SKR Yu Z Morrison M and Firkins JL. 2004. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. Journal of Nutrition 134: 3378–3384.

Tajima K Aminov RI Nagamine T Matsui H Nakamura M and Benno Y. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology 67: 2766–2774.

Tang SX Tayo GO Tan ZL Sun ZH Shen LX Zhou CS Xiao WJ Ren GP Han XF and Shen SB. 2008. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme supplementation on in vitro fermentation characteristics of low-quality cereal straws. Journal of Animal Science 86: 1164-1172.

Tripathi MK and Karim MS. 2010. Effect of individual and mixed live yeast culture feeding on growth performance, nutrient utilization and microbial crude protein synthesis in lamb. Animal Feed Science and Technology 155: 163-171.

Watanabe Y Kim YH Kushibiki S Ikuta K Ichijo T and Shigeru S. 2019. Effects of active dried Saccharomyces cerevisiae on ruminal fermentation and bacterial community during the short-term ruminal acidosis challenge model in Holstein calves. Journal of Dairy Science 102: 6518-6531.

Williams PE Tait CA Innes GM and Newbold CJ. 1991. Effects of the inclusion of yeast cultures (Saccharomyces cerevisiae plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentations patterns in the rumen of steers. Journal of Animal Science 69: 3016-3022.

Wolin MJ and Miller TL. 1988. Microbe-microbe interactions. In: P.N. Hobson and C.S. Stewart (eds.) In: The rumen microbial ecosystem. Springer, Heidelberg, Germany pp: 467-491.

Yang SL Bu DP Wang JQ Hu ZY Li D Wei HY Zhou LY and Loor JJ. 2009. Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. Animal 3: 1562–1569.

Effects of supplementing *saccharomyces cerevisiae* yeast probiotics on rumen fermentation parameters of high concentrate level total mixed rations *in vitro*

E PirAdl[1], H Khalilvandi-Behroozyar[2], M Kazemi-Bonchenari[3], R Pirmohammadi[4] and M Hosseini Ghafari[5]

Received: November 24, 2021 Accepted: May 5, 2022

[1] PhD Candidate, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Animal Sciences Urmia University, Iran
[3] Associate Professor, Ruminant Nutrition, Department of Animal Sciences Arak University, Iran
[4] Professor, Department of Animal Sciences Urmia University, Iran
[5] Research Assistant, Institute for Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Bonn, Germany
*Corresponding author: E mail: h.khalilvandi@urmia.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research

Journal of Animal Science/vol.33 No.4/ 2024/pp 61-81
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/AS.2022.49527.1643

Introduction: *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most common probiotics used in ruminant nutrition. *Saccharomyces cerevisiae* increase gas production through specific biochemical mechanisms. Some of these mechanisms, based on the yeast's ability to excrete excess oxygen from the rumen, create a better space for ruminal anaerobic bacteria. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can provide a place for metabolic exchange and a suitable environment for the growth and activity of beneficial microorganisms around the substrates. On the other hand, increased gas production by adding yeast may be due to increased propionate fatty acid production due to improved ruminal fermentation. Because carbon dioxide is produced by some rumen bacteria through the succinate-propionate pathway when propionate is produced. Because the fermentation of dietary carbohydrates into volatile fatty acids produces gases in the rumen that are mainly hydrogen, carbon dioxide, and methane, the addition of yeast not only has the potential to improve gas production, but can cause qualitative changes in the gases produced and reduce the negative impact on the environment. The addition of yeast in concentrated diets increased the population of fiber decomposing microorganisms compared to the control group without adding yeast (Callaway& Martin 1997; Dehghan-Banadaky et al. 2012). Yeast also directly stimulates ruminal fungi, which may improve fiber digestion. Gas production forms the basis of any substrate, mainly dependent on the availability of nutrients for ruminal microorganisms it is quite clear that the increase in gas production was due to the increase in crude protein content. It is well known that *Saccharomyces cerevisiae* can reduce the production of ammonia in the rumen. Ammonia emissions from cattle manure reduces by reducing protein degradation and overall nitrogen excretion by the animal. The direct result of this action is an increase in protein bypass in the rumen, which is absorbed and metabolized as a real protein in the gastrointestinal tract and small intestine. Reducing the latency phase by increasing the protein content (for example, a diet with higher crude protein) indicates the rapid activity of *Saccharomyces cerevisiae* on the fermentation process. In addition, *Saccharomyces cerevisiae* contains small peptides and other nutrients that are needed by the dominant ruminal cellulite bacteria to initiate growth. The activity of *Saccharomyces cerevisiae* depends on many factors, including the availability of nutrients to rumen microorganisms, which stimulates the

fermentation process (Newbold et al. 1995). This study aimed to investigate the effects of yeast supplementation on fermentation parameters in total mixed rations *in vitro*.

Materials and methods: Accordingly, the effect of 4 levels of yeast supplementation involved, zero, 4, 8, and 12 mg/g of yeast in two TMR diets containing 60 and 70% of concentrates, on the kinetics and parameters of gas production, rumen fermentation parameters including pH, ammonia nitrogen, concentration and profiles of volatile fatty acids, and true digestibility of dry matter and neutral detergent fibers were evaluated. In addition, the effect of yeast supplementation on the population of protozoa, anaerobic fungi, and cellulolytic microorganisms were evaluated using molecular techniques. In this experiment, three adult Holstein steers equipped with ruminal fistulas were used to prepare ruminal fluid. For the polymerase chain reaction, after sequencing of the primers, the extracted DNA was amplified using PCR to check primer specificity. DNA amplification was examined by the system (R-T PCR) with three replications for each pair of primers.

Results and discussion: The addition of different levels of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation caused a significant increase ($P<0.05$) in the amount of gas produced by increasing the incubation time of experimental diets. The results show that there is a statistically significant difference ($P<0.05$) between different levels of supplementation; so that from 24 hours after incubation onwards, the highest amount of gas produced in the experimental diets was at the level of 12 mg/g supplement was observed. The addition of different levels of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation caused a significant increase ($P<0.05$) in the total amount of VFA produced in the rumen with increasing levels of supplementation in experimental diets. The results show that there is a statistically significant difference ($P<0.05$) between different levels of supplementation so that the highest amount of total VFA produced in both diets was observed at the level of 12 mg/g supplement. The effect of adding different levels of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters caused a significant increase ($P<0.05$) in ruminal pH and a decrease in ruminal ammonia production by increasing the level of supplementation in experimental diets. The results show that there is a statistically significant difference between different levels of supplementation so that the greatest increase in ruminal pH and decrease in ammonia production in experimental diets at the level of 12 mg/g. The effect of diet type was also significantly different ($P<0.05$). The highest increase in ruminal pH and decrease in ammonia production was observed in diets containing 60% concentrate. The results of this study showed that the yeast supplementation in high fermentative TMR diets increased ($P<0.05$) the rumen environmental stability, increased ($P<0.05$) the fermentability of dietary insoluble fraction, reduced ($P<0.05$) the gas production rate and reduced ($P<0.05$) the lag phase. addition of *Saccharomyces cerevisiae* in higher crude protein diets, improved of the dry matter digestibility. Nutrient analysis without affecting the digestibility of insoluble fibers in neutral detergent and the digestibility of soluble fibers in acidic detergent with diets containing higher crude vitamin, even with the addition of *Saccharomyces cervicia*, improved dry matter digestibility and organic matter digestibility. However, *Saccharomyces cerevisiae* only affects the edibility of the desiccant. Both diets had different crude production. Therefore, improving the treatability of dry matter and the edibility of organic matter was the result of increasing the raw material, which improved micro activities in the rumen.

Conclusions: Yeast supplementation improved fiber digestibility and reduced lactate accumulation and LPS concentration by stabilizing the anaerobic environment in the rumen and stimulating the growth and activity of fiber-degrading microorganisms.

Keywords: Cellulolytic bacteria, Fiber digestibility, Gas production, Lactate, LPS