نشخوارکنندگان و پویایی شکمبه

(تولید تا بیوگاز)

تألیف و تدوین:

مجید شریفی

علی اکبر خادم

انتشارات دانش نگار

سرشناسه	:	شریفی، مجید، ۱۳۵۸ -
عنوان و نام پدیدآور	:	نشخوارکنندگان و پویایی شکمبه (تولید تا بیوگاز) / تالیف و تدوین مجید شریفی، علی اکبر خادم.
مشخصات نشر	:	تهران: دانش نگار، ۱۳۹۱.
مشخصات ظاهری	:	۴۶۴ ص.: مصور (بخش رنگی)، جدول.
شابک	:	978-964-2927-67-8
وضعیت فهرست نویسی	:	فیپا
یادداشت	:	کتابنامه
یادداشت	:	نمایه
موضوع	:	نشخوارکنندگان -- تغذیه
موضوع	:	نشخوارکنندگان – اندام های گوارشی
موضوع	:	شکمبه -- تخمیر
موضوع	:	شکمبه – میکروب شناسی
موضوع	:	بیوگاز
شناسه افزوده	:	خادم، علی اکبر، ۱۳۳۵ -
رده بندی کنگره	:	۱۳۹۱ ۹ پ۴۳ش/SF ۹۵
رده بندی دیویی	:	۶۳۶/۲۰۸۵۲
شماره کتابشناسی ملی	:	۲۶۰۰۸۱۷

دانش نگار

www.daneshiran.ir

نشخوارکنندگان و پویایی شکمبه- تولید تا بیوگاز

تالیف: مجید شریفی، دکتر علی اکبر خادم

چاپ و صحافی: فرنگاررنگ

ناشر: انتشارات دانش نگار

سال و نوبت چاپ: ۱۳۹۱-

شابک: ۸-۶۷-۲۹۲۷-۹۶۴-۹۷۸

قیمت: ۷۵۰۰۰ ریال

شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

تهران، انقلاب، خیابان منیری جاوید (اردیبهشت)، نبش وحید نظری، شماره ۱۴۲

تلفن: ۶۶۴۰۰۱۴۴ دورنگار: ۶۶۴۰۰۲۲۰

این اثر مشمول قانون حمایت از حقوق مولفان و مصنفان و هنرمندان مصوب ۱۳۴۸ است. هرکس تمام یا قسمتی از این اثر را بدون اجاز ناشر، نشر یا پخش یا عرضه کند مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی

در آغاز حمد و سپاس خالق حکیمی را که توانایی خلق اثرات علمی را بر بندگان خویش مرحمت فرمود. در تالیف این کتاب از آثار و یافته های علمی و عملی بسیاری از محققین مراکز علمی و پژوهشی استفاده شده است که ضمن ذکر نام پدید آورندگان آن در پایان هر بخش، در این قسمت از همه آنها تشکر و قدردانی می شود.

علاوه بر این، از نظرات بسیاری از متخصصین میکروبیولوژی، زیست شناسی، بیوشیمی و کارشناسان علوم دامی که از نزدیک از آنها بهره مند شدیم، تشکر و از همکاری بی دریغ آنها سپاسگذاری می نماییم. همچنین مولفین وظیفه خود می دانند از سرکار خانم مرضیه صفدری که در ویرایش این اثر کمک شایانی نموده اند، قدردانی نمایند.

در پایان از تمامی عزیزانی که فرصت مطالعه کتاب مزبور را پیدا کرده اند، مصرانه خواهشمندیم تصحیحات و انتقادات خود را به آدرس: تهران – دانشگاه تهران – پردیس ابوریحان – دانشکده علوم دامی ارسال نمایند تا به حول قوه الهی در چاپ های بعدی مورد استفاده قرار گیرد. در انتها این کتاب را به همه کسانی که در جهت سرافرازی این کشور قدم بر می دارند، به خانواده و به تمامی دانشجویان و دانش پژوهان تقدیم می نماییم.

پیش گفتار

انگیزه نوشتن این کتاب زمانی آغاز گردید که در گروه علوم دامی مبحث پویایی شکمبه و عوامل موثر بر آن پیش گرفته شد. اما به دلیل فقدان اطلاعات و کتاب های درسی لازم، عده ای از دانشجویان بالاجبار بررسی پویایی شکمبه را از حیطه کاری خود دور می نمایند. لذا تصمیم بر آن شد با نوشتن این اثر - که اطلاعات اجمالی و مناسب ترین منابع را در این زمینه در اختیار دانش پژوهان و دانشجویان قرار می دهد - مسائل پویایی شکمبه با قدرت بیشتری در ایران پیگیری شود.

از اهلی کردن دام ها بیش از ده هزار سال می گذرد. اما، زمینه های علمی در باب پویایی و محیط شکمبه جدید و تقریبا جعبه تاریک اکثر دانشجویان علوم دامی، دامپزشکی و حتی زیست شناسی محسوب می گردد. در این کتاب سعی شده است که به اساسی ترین پرسش های رایج دانشجویی در این جعبه پاسخ داده شود. می دانیم که شناخت شکمبه و فعالیت های زیستی آن این امکان را برای محققین و کشاورزان فراهم می نماید تا بتوانند درک صحیح تری از تغذیه نشخوارکنندگان و تولیدات آنها داشته باشند. بنابراین تلاش شده، مهمترین عوامل موثر بر تخمیر به شکل پویا بررسی و معادلات مفهومی آن ارائه گردد. اما به دلیل حضور میکروارگانیسم ها در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان و اهمیت اثر آنها بر پویایی شکمبه قدرت بیان مسائل توسط معادلات مزبور به سبب تغییرات روزانه و یا سالانه آنها با مشکلاتی مواجه باشد. لذا برای بررسی پویایی شکمبه شناخت این طبقه از موجودات لازم تلقی می گردد. دانش ما در زمینه میکروب شناسی شکمبه نوپا و بیشتر براساس کشت های میکروبی درون آزمایشگاهی انجام شده است. اگر چه تلاش های مناسبی در زمینه آزمایش مزرعه ایی صورت گرفته است، اما با وجود پیشرفت های فراوان جوابگوی پرسش های محققین نمی باشد. از طرفی فنون جداسازی میکروبی، روش های مختلف آزمایشی و نوع وسایل اندازه گیری این شناسایی را به دلیل نسبی بودن علوم مربوطه و تغییر پذیری آنها در واحد زمانی متغییر می سازد. لذا کارشناسان همواره به دنبال راه حلی بوده اند که بتوانند با دقت بیشتری به شناسایی تک یاخته ها و اثرات آنها بر تخمیر بپردازند. بدین ترتیب علوم ژنتیک را به این عرصه وارد و روند تغییرات آن را در واحد زمان پیگیری نمودند. اما باز به دلیل تاثیر فراوان عوامل غیر ژنتیکی شناخته شده و ناشناخته بر پویایی شکمبه علوم مربوط به آن همچنان در حال تغییر و بروز رسانی می باشد. نهایتا در سال های اخیر به دلیل تاکید بر افزایش تولیدات دام های اهلی بدون ازدیاد جمعیت آنها و همچنین کاهش متان تولیدی به دلیل اثر نامطلوب بر محیط زیست سبب شده است شناسایی فعالیت های شکمبه و تغییرات آن با شتاب بیشتری

روبرو شود. ولی این شتاب در کشورهای در حال توسعه کم و گاه به دلیل ضعف امکانات آزمایشگاهی، عدم برنامه ریزی دقیق و پیوسته در نهادهای اجتماعی- تولیدی نادیده گرفته شده است.

از آنجا که مطالب حاضر در این کتاب بیشتر اطلاعات و مدارک مورد تایید محققین می باشد، می تواند راهگشا و پایه ریز بسیاری از فرضیات جدید تلقی گردد. لذا امیدواریم مطالعه این کتاب توسط کارشناسان و دانشجویان بتواند افق های روشنی را در جهت پویایی شکمبه و عوامل موثر بر آن پیش روی آنان باز نموده و سطح دانش علمی و عملیاتی آنان را به گستره جدید و قابل فهم و قیاس رهنمون سازد. البته بر این باوریم که تنها خداوند کمال مطلق است و بی شک هر کاری از بشر خالی از ایراد نمی باشد. لذا ادامه و فعالیت مطلوب این حرکت منوط به نظرات و انتقادات شما صاحب نظران و مطالعه کنندگان بوده و مشتاق بهره مندی از آن هستیم.

به امید فردایی بهتر و پویاتر برای ملت خداجوی این مرز و بوم

مولفین

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : علف خواران و نشخوارکنندگان

۱-۱ رده بندی علف خواران ۲۳

۱-۲ تغییرات ساختاری و عادت پذیری علف خواران ۲٦

۱-۲-۱ تغییرات ریخت شناسی ۲٦

۱-۲-۲ تغییرات ساختمانی بدن ۲۷

۱-۲-۳ تغییرات رفتاری ۲۸

۱-۳ تفاوت ساختاری دستگاه گوارش علف خواران ۲۹

۱-۳-۱ تفاوت در وضعیت دهانی ۲۹

۱-۳-۲ تفاوت در غدد ترشحی ۳۰

۱-۳-۳ تفاوت در شکل ظاهری و کارآیی دستگاه گوارشی ۳۱

۱-۴ نشخوارکنندگان و توسعه معده چند قسمتی ۳۳

۱-۴-۱ توسعه شکمبه در دوران شیر خوارگی ۳٤

۱-۴-۲ توسعه شکمبه در دوران رشد و تولید ۳۷

۱-۴-۳ مزیت معده چند قسمتی یا تخمیری ۳۷

۱-۵ جهت مطالعه بیشتر ۳۹

بخش دوم : هضم، جذب و متابولیسم

۲-۱ دستگاه گوارش در نشخوارکنندگان ٤۲

۲-۱-۱ خصوصیات شکمبه ٤۳

۲-۲ هضم مواد غذایی در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان ٤٥

۲-۲-۱ هضم میکروبی ٤٥

۲-۲-۲ هضم ترشحی ٤۸

۲-۳ جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان ٥۰

۲-۳-۱ جذب شکمبه - نگاری ٥۱

۲-۳-۲ جذب روده ایی ٥۳

۲-۴ متابولیسم در شکمبه ٥٥

۱-۴-۲ انرژی ۵٦
۱-۱-۴-۲ منابع انرژی ۵۸
۲-۱-۴-۲ کارآیی انرژی (Y_{ATP}) ۵۹
۲-۴-۲ کربوهیدرات ٦۳
۳-۴-۲ پروتئین ٦۷
۱-۳-۴-۲ تعادل انرژی به پروتئین و آزادسازی همزمان آنها ۷۱
۲-۳-۴-۲ سنتز پروتئین میکروبی ۷۵
۴-۴-۲ چربی ۷۹
۵-۴-۲ مواد معدنی و ویتامین ها ۸٤
۵-۲ کنترل متابولیسم ۸۵
۶-۲ برای مطالعه بیشتر ۸٦

بخش سوم: میکروارگانیسم های شکمبه

۱-۳ طبقه بندی میکروارگانیسم ها ۹۱
۱-۱-۳ شناسایی میکروارگانیسم ها از طریق تکنیک Real-time PCR ۹۳
۲-۳ رشد و تغذیه میکروارگانیسم ها ۹۷
۳-۳ محل قرارگیری و چگونگی فعالیت میکروارگانیسم ها ۱۰۲
۱-۳-۳ چگونگی فعالیت میکروارگانیسم ها ۱۰۵
۱-۱-۳-۳ اتصال به سوبسترا ۱۰۷
۲-۱-۳-۳ فعالیت های گروهی میکروارگانیسم ها ۱۰۸
۲-۳-۳ تراکم و گسترش جمعیت میکروبی ۱۱۱
۱-۲-۳-۳ عوامل خوراکی موثر بر جمعیت میکروبی ۱۱۲
۲-۲-۳-۳ عوامل دامی و محیطی موثر بر جمعیت میکروبی ۱۱٤
۳-۲-۳-۳ تاسیس و توسعه میکروارگانیسم ها در شکمبه ۱۱۵
۴-۳ فرآیند تخمیر و الگوهای آن ۱۱۸
۱-۴-۳ الگوی فیزیکی تخمیر ۱۱۹
۲-۴-۳ الگوی شیمیایی تخمیر ۱۲۳
۱-۲-۴-۳ تولیدات تخمیری ۱۲۳

۳-۴-۲-۲ روندها و فرآیندهای شیمیایی تخمیر ۱۲۵
۳-۴-۳ عوامل بحران در تخمیر شکمبه ۱۳٤
۳-۴-۳-۱ اسیدوز ۱۳۵
۳-۴-۳-۲ نفخ ۱۳٦
۳-۴-۳-۳ مسمومیت عناصر غذایی ۱۳۷
۳-۴-۳-۴ تغییرات ظاهری دستگاه گوارش ۱۳۸
۳-۵ برای مطالعه بیشتر ۱۳۸

بخش چهارم: باکتری های شکمبه

۴-۱ تکنیک های باکتری شناسی ۱٤۳
۴-۱-۱ شجره زیستی باکتری ها ۱٤٤
۴-۱-۲ ریخت شناسی و ساختار باکتریایی ۱٤۵
۴-۱-۲-۱ ساختمان شیمیایی باکتری ها ۱٤۸
۴-۲ کشت باکتری ها ۱٤۹
۴-۲-۱ نمونه گیری ۱٤۹
۴-۲-۲ روش های کشت باکتری ۱۵۱
۴-۲-۲-۱ آماده سازی محیط کشت ۱۵۲
۴-۲-۲-۲ کشت خالص ۱۵٤
۴-۲-۲-۳ کشت مخلوط ۱۵۵
۴-۲-۲-۴ کشت های میانی (in vivo-in vitro) ۱۵٦
۴-۲-۳ نگهداری محیط کشت ۱۵۸
۴-۲-۴ شمارش باکتری ها ۱۵۸
۴-۲-۴-۱ شمارش مستقیم ۱۵۸
۴-۲-۴-۲ شمارش کشت یا زنده ۱۵۹
۴-۳ طبقه بندی باکتری های شکمبه ۱۵۹
۴-۳-۱ طبقه بندی باکتری ها براساس گروه زیستی ۱٦۰
۴-۳-۱-۱ باکتری های بی هوازی اختیاری ۱٦۰
۴-۳-۱-۲ باکتری های بی هوازی ۱٦۳

۲-۳-۴ طبقه بندی باکتری ها براساس گروه فعالیتی ۱٦٤
۱-۲-۳-۴ باکتری های هضم کننده سلولز ۱٦٥
۲-۲-۳-۴ باکتری های هضم کننده نشاسته ۱٦۹
۳-۲-۳-۴ باکتری های هضم کننده همی سلولز ۱۷۲
۴-۲-۳-۴ باکتری های هضم کننده پکتین ۱۷٤
۵-۲-۳-۴ باکتری های تخمیر کننده قند ۱۷٦
۶-۲-۳-۴ باکتری های تخمیر کننده اسید ۱۷۸
۷-۲-۳-۴ باکتری های تولید کننده متان ۱۸۰
۸-۲-۳-۴ باکتری های تجزیه کننده پروتئین ۱۸۲
۹-۲-۳-۴ باکتری های تولید کننده آمونیاك و اوره ۱۸۳
۱۰-۲-۳-۴ باکتری های تجزیه کننده چربی ۱۸٤
۴-۴ فعالیت های حیاتی در باکتری ها ۱۸٥
۱-۴-۴ رشد ۱۸٦
۲-۴-۴ تکثیر ۱۸۷
۳-۴-۴ تبادل ۱۸۸
۴-۴-۴ ایمنی ۱۸۹
۴-۵ مکانیسم اتصال و هضم باکتریایی ۱۹۰
۴-۶ جمعیت باکتری ها در شکمبه ۱۹۸
۱-۶-۴ اثر خوراک بر جمعیت باکتری ها ۱۹۹
۲-۶-۴ اثر خصوصیات مخزن تخمیر بر جمعیت باکتری ها ۲۰۰
۳-۶-۴ اثرات بیرونی مخزن تخمیر بر جمعیت باکتری ها ۲۰۲
٤-۷ برای مطالعه بیشتر ۲۰۳

بخش پنجم: پروتوزوئرهای شکمبه

۵-۱ تکنیک های شناسایی پروتوزوئرها ۲۰۹
۵-۲ روش های مطالعه پروتوزوئرهای شکمبه ۲۱۲
۱-۲-۵ کشت پروتوزوئرها ۲۱۳
۲-۲-۵ شمارش پروتوزوئرها ۲۱٤

۳-۲-۵ شناسایی پروتوزوئرها ۲۱۵
۳-۵ طبقه بندی پروتوزوئرهای شکمبه ۲۱۶
۱-۳-۵ طبقه بندی پروتوزوئرها براساس رفتار حرکتی ۲۱۶
۱-۱-۳-۵ تاژک داران یا ماستیگوفورآ ۲۱۶
۲-۱-۳-۵ مژک داران یا سیلیاتا ۲۱۷
۳-۱-۳-۵ ریشه پایان یا سارکودینا ۲۱۷
۴-۱-۳-۵ اسپوروزوآ ۲۱۸
۵-۱-۳-۵ مکنده ها یا سوکتوریا ۲۱۸
۲-۳-۵ طبقه بندی پروتوزوئرها براساس ریخت شناسی ۲۱۸
۱-۲-۳-۵ شاخه ساکروماستیگوفورآ (Sacromastigophora) ۲۱۹
۲-۲-۳-۵ شاخه سیلیوفورا ۲۲۰
۴-۵ فعالیت های حیاتی در پروتوزوئرها ۲۲۶
۱-۴-۵ رشد ۲۲۷
۲-۴-۵ تکثیر ۲۲۷
۳-۴-۵ تبادل ۲۲۸
۴-۴-۵ ایمنی ۲۲۹
۵-۵ فعالیت تخمیری پروتوزوئرها ۲۳۰
۱-۵-۵ اتصال پروتوزوئرها به مواد مغذی ۲۳۰
۲-۵-۵ متابولیسم پروتوزوئرها ۲۳۲
۱-۲-۵-۵ تخمیر کربوهیدرات ها ۲۳۲
۲-۲-۵-۵ تخمیر پروتئین ها ۲۳۶
۳-۲-۵-۵ تخمیر چربی ها ۲۳۸
۳-۵-۵ متابولیسم میانی در پروتوزوئرها ۲۳۸
۱-۳-۵-۵ فعالیت های تنفسی در پروتوزوئرها ۲۴۰
۶-۵ جمعیت پروتوزوئرها ۲۴۰
۱-۶-۵ اثر خوراک بر جمعیت پروتوزوئرها ۲۴۱
۲-۶-۵ اثر خصوصیات مخزن تخمیر بر جمعیت پروتوزوئرها ۲۴۳
۳-۶-۵ اثرات بیرونی مخزن تخمیر بر جمعیت پروتوزوئرها ۲۴۴

۵-۷ اثر متقابل پروتوزوئرها با سایر میکروارگانیسم های شکمبه ۲۴۹
۵-۸ برای مطالعه بیشتر ۲۵۰

بخش ششم: قارچ های شکمبه

۶-۱ تکنیک های شناسایی پروتوزوئرها ۲۵۶
۶-۲ روش های مطالعه قارچ های شکمبه ۲۵۹
۶-۲-۱ کشت قارچ های بی هوازی ۲٦۰
۶-۲-۱-۱ کشت همزمان ۲٦۱
۶-۲-۲ جداسازی و شمارش قارچ ها ۲٦۲
۶-۲-۳ شناسایی قارچ ها ۲٦۳
۶-۳ طبقه بندی قارچ های شکمبه ۲٦٤
۶-۳-۱ طبقه بندی قارچ ها براساس خصوصیات ریخت شناسی ۲٦٥
۶-۳-۱-۱ جنس نئوکالیماستیکس ۲٦٦
۶-۳-۱-۲ جنس پیرومایسس ۲٦٧
۶-۳-۱-۳ جنس سکومایسس ۲٦٧
۶-۳-۱-۴ جنس اورپینومایسس ۲٦٨
۶-۳-۱-۵ جنس آنایرومایسس ۲٦٩
۶-۳-۱-۶ جنس سیلامایسس ۲٦٩
۶-۴ چرخه زندگی قارچ های شکمبه ۲٧۰
۶-۴-۱ فعالیت های حیاتی قارچ ها ۲٧۱
۶-۴-۱-۱ رشد ۲٧۱
۶-۴-۱-۲ تکثیر ۲٧۲
۶-۴-۱-۳ تبادل ۲٧٤
۶-۴-۱-۴ ایمنی ۲٧٤
۶-۵ ساختمان شیمیایی قارچ ها ۲٧٥
۶-۵-۱ ساختمان شیمیایی دیواره سلولی قارچ ها ۲٧٦
۶-۶ فعالیت تخمیری قارچ ها ۲٧٧
۶-۶-۱ اتصال قارچ ها به مواد مغذی ۲٧٨

۲-۶-۶ متابولیسم قارچ ها ۲۷۹
۱-۲-۶-۶ تخمیر کربوهیدرات ها ۲۸۰
۲-۲-۶-۶ تخمیر پروتئین ها ۲۸۲
۳-۲-۶-۶ تخمیر چربی ها ۲۸۳
۳-۶-۶ متابولیسم میانی در قارچ ها ۲۸٤
۱-۳-۶-۶ آنزیم در قارچ های بی هوازی ۲۸٤
۷-۶ جمعیت قارچ ها ۲۸۵
۱-۷-۶ اثر خصوصیات مخزن تخمیر بر جمعیت قارچ های شکمبه ۲۸٦
۲-۷-۶ اثرات بیرونی مخزن تخمیر بر جمعیت قارچ های شکمبه ۲۸۷
۳-۷-۶ اثر خوراک مصرفی بر جمعیت قارچ ها ۲۸۷
۱-۳-۷-۶ علوفه ها ۲۸۷
۲-۳-۷-۶ دانه ها ۲۸۹
۳-۳-۷-۶ دفعات خوراک دهی ۲۸۹
۸-۶ اثر متقابل قارچ ها با سایر میکروارگانیسم های شکمبه ۲۸۹
۱-۸-۶ رفتار متقابل قارچ ها با باکتری ها ۲۹۰
۲-۸-۶ رفتار متقابل قارچ ها با پروتوزوئرها ۲۹۳
۹-۶ برای مطالعه بیشتر ۲۹٤

بخش هفتم: طراحی عملکرد شکمبه

۱-۷ تاریخچه الگونویسی ۲۹۹
۱-۱-۷ کاربرد عملی الگونویسی ۳۰۰
۲-۱-۷ اصول الگونویسی ۳۰۲
۱-۲-۱-۷ فرضیه و تعاریف ۳۰۳
۲-۲-۱-۷ متغیرهای مورد بررسی در الگوها ۳۰٤
۳-۲-۱-۷ واحد آماری ۳۰۵
۲-۷ شاخص های اصلی الگونویسی در عملکرد شکمبه ۳۰٦
۱-۲-۷ قابلیت تجزیه پذیری مواد مغذی ۳۰۷
۲-۲-۷ فعالیت های میکروبی ۳۱۰

۷-۲-۳ فعالیت های جنبشی ذرات ۳۱۵
۷-۲-۳-۱ الگوی فعالیت جنبشی ذرات براساس الگوی تک مخزنی ۳۱۷
۷-۲-۳-۲ الگوی فعالیت جنبشی ذرات براساس الگوی چند مخزنی ۳۱۹
۷-۲-۳-۳ اثر فعالیت های جنبشی ذرات بر رشد میکروارگانیسم ها ۳۲۲
۷-۳ الگونویسی هضم فیبر ۳۲۲
۷-۳-۱ الگوی حداقلی هضم فیبر ۳۲٤
۷-۳-۲ الگوی ماندگاری انتخابی ۳۲۵
۷-۳-۳ الگوی تاخیری هضم فیبر ۳۲۷
۷-۴ الگونویسی فعالیت های تخمیری اسیدهای چرب فرار ۳۲۸
۷-۴-۱ شبیه سازی فاکتورهای موثر بر تخمیر اسیدهای چرب فرار ۳۲۸
۷-۴-۱-۱ الگوی BA ۳۳۰
۷-۴-۱-۲ الگوی DA ۳۳۱
۷-۴-۱-۳ الگوی DI ۳۳۲
۷-۴-۲ الگوهای جذب اسیدهای چرب فرار ۳۳٤
۷-۴-۲-۱ نرخ جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه براساس الگوی DI ۳۳٦
۷-۴-۳ پیش بینی اسیدهای چرب فرار براساس الگوهای دینامیکی عناصر سازنده ۳۳۸
۷-۴-۴ برنامه مصرف خوراک در الگونویسی اسیدهای چرب فرار ۳٤۰
۷-۵ الگونویسی پروتئین میکروبی ۳٤۲
۷-۵-۱ شبیه سازی فاکتورهای موثر بر متابولیسم پروتئین در شکمبه ۳٤۲
۷-۵-۲ مخزن تخمیری میکروب ها در متابولیسم پروتئین ۳٤۵
۷-۵-۲-۱ مخزن تخمیری میکروب های آمیلولایتیک (Q_{Ma}) به گرم ۳٤٦
۷-۵-۲-۲ مخزن تخمیری میکروب های سلولایتیک (Q_{Mc}) به گرم ۳٤۷
۷-۵-۳ مخزن پروتئین های مصرفی در متابولیسم پروتئین ۳٤۷
۷-۵-۳-۱ مخزن پروتئین قابل هضم (Q_{Pd}) به مول ۳٤۸
۷-۵-۳-۲ مخزن پروتئین محلول در مایع شکمبه (Q_{Ps}) به مول ۳٤۸
۷-۵-۳-۳ مخزن پروتئین غیر قابل تجزیه شکمبه (Q_{Pu}) به مول ۳۵۰
۷-۵-۳-۴ مخزن آمونیاک در شکمبه (Q_{Am}) به مول ۳۵۰
۷-۶ الگونویسی چربی ها در شکمبه ۳۵۲

۱-۶-۷ شبیه سازی فاکتورهای موثر بر متابولیسم چربی در شکمبه ۳۵۲
۱-۱-۶-۷ مخزن چربی هیدرولیز نشده (Q_{Ly}) ۳۵۳
۲-۱-۶-۷ مخزن اسیدهای چرب بلند زنجیره اشباع شده (Q_{Fs}) ۳۵۳
۳-۱-۶-۷ مخزن اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع (Q_{Fu}) ۳۵٤
۷-۷ الگونویسی اسیدیته در شکمبه ۳۵۵
۱-۷-۷ الگوی اسیدیته در شکمبه ۳۵۵
۱-۱-۷-۷ الگوی اختلاف قدرت یونی در تنظیم اسیدیته شکمبه ۳۵۵
۲-۱-۷-۷ الگوی بافر در تنظیم اسیدیته شکمبه ۳۵٦
۳-۱-۷-۷ الگوی دی اکسیدکربن در تنظیم اسیدیته شکمبه ۳۵٦
۴-۱-۷-۷ الگوی اسیدهای چرب فرار در تنظیم اسیدیته شکمبه ۳۵۷
۸-۷ الگونویسی تولید گاز در شکمبه ۳۵۸
۱-۸-۷ الگوی تولید گاز در حالت In vitro ۳۵۸
۲-۸-۷ تولید متان براساس الگوهای آماری ۳٦۰
۳-۸-۷ تولید متان براساس الگوهای تناوبی دینامیکی ۳٦۲
۹-۷ الگوهای ترمودینامیکی در شکمبه ۳٦۳
۱-۹-۷ اصول اولیه ترمودینامیک ۳٦۵
۲-۹-۷ الگوی تخمیری شکمبه در مسیر ترمودینامیک ۳٦٦
۱-۲-۹-۷ ناظم بخش های تخمیری شکمبه در الگوی ترمودینامیک Fo ۳٦۷
۲-۲-۹-۷ تولید متان و کاهش استات در الگوی ترمودینامیک Fo ۳٦۸
۳-۲-۹-۷ جمعیت میکروبی در الگوی ترمودینامیک Fo ۳۷۱
۳-۹-۷ کارآیی الگوی ترمودینامیک در شکمبه ۳۷۱
۴-۹-۷ تغییر نسبت اسیدهای چرب فرار در الگوی ترمودینامیک ۳۷۳
۱۰-۷ برای مطالعه بیشتر ۳۷۵

بخش هشتم: دستکاری زیستی شکمبه

۱-۸ تاریخچه دستکاری فعالیت های زیستی در شکمبه ۳۸۳
۱-۱-۸ تعریف دستکاری فعالیت های زیستی ۳۸٤
۲-۸ تغییر روند شیمیایی تخمیر در دستکاری های شکمبه ای ۳۸٤

۱-۲-۸ دستکاری براساس تغییر روند تخمیر کربوهیدرات ۳۸۵
۲-۲-۸ دستکاری براساس تغییر روند تخمیر نیتروژن ۳۸۷
۳-۲-۸ دستکاری براساس تغییر روند تخمیر چربی ها ۳۸۸
۱-۳-۲-۸ اثر چربی بر متابولیسم کربوهیدرات و نیتروژن در شکمبه ۳۸۹
۳-۸ اثر خوراک مصرفی بر دستکاری های شکمبه ای ۳۹۱
۱-۳-۸ دستکاری براساس تغییر میزان خوراک مصرفی ۳۹۱
۱-۱-۳-۸ عمل آوری فیزیکی ۳۹۲
۲-۳-۸ دستکاری براساس تغییر کیفیت خوراک مصرفی ۳۹۳
۱-۲-۳-۸ عمل آوری شیمیایی ۳۹٤
۳-۳-۸ دستکاری براساس ورود مواد غیر مغذی ۳۹۵
۱-۳-۳-۸ بافرها ۳۹۵
۲-۳-۳-۸ یونفرها ۳۹٦
۳-۳-۳-۸ زئولیت ها (کلینوپتیلولیت Clinoptilolite) ۳۹۹
۴-۳-۳-۸ پروبیوتیک و پربیوتیک ها ٤۰۱
۵-۳-۳-۸ آنزیم ها ٤۰٤
۶-۳-۳-۸ آنتی بیوتیک ها ٤۰٦
۷-۳-۳-۸ اسیدهای آلی ٤۱۰
۴-۳-۸ دستکاری براساس ورود سموم مصرفی ٤۱۲
۱-۴-۳-۸ ترکیبات ضد تغذیه ایی گیاهی ٤۱۲
۲-۴-۳-۸ عناصر معدنی و صنعتی ضد تغذیه ای ٤۲۱
۳-۴-۳-۸ سموم میکروبی ٤۲۳
۴-۴-۳-۸ استراتژی حذف سموم مصرفی ٤۲۷
۴-۸ سایر عوامل موثر بر دستکاری های شکمبه ای ٤۲۷
۱-۴-۸ ناهنجاری های متابولیکی ٤۲۸
۲-۴-۸ عادات غذایی ٤۲۹
۵-۸ دستکاری های ژنتیکی ٤۳۰
۱-۵-۸ اصول دستکاری ژنتیکی ٤۳۰
۲-۵-۸ خواص دستکاری ژنتیکی ٤۳۱

۳-۵-۸ رایج ترین دستکاری های ژنتیکی ٤٣٢
۶-۸ تغییر تولید متان در دستکاری های میکروبی ٤٣٤
۱-۶-۸ تشکیل متان ٤٣٥
۲-۶-۸ عوامل موثر بر تولید متان ٤٣٦
۷-۸ برای مطالعه بیشتر ٤٣٨

فصل نهم: ضمائم

۱-۹ واژه نامه ٤٤٦

فهرست جداول صفحه

جدول ۱-۱ آمار جمعیت دام در ایران و جهان ۲۲
جدول ۲-۱ درصد پراکنش نشخوارکنندگان واقعی و اثر زیستگاه، آب و هوا و قاره ها بر روی آنها ۳٤
جدول ۳-۱ مهمترین نشخوارکنندگان اهلی و جزئیات اهلی شدن آنها ۳۵
جدول ۱-۲ کارآیی انرژی و تعادل نیتروژن به انرژی برای رشد میکروارگانیسم های شکمبه ٦۰
جدول ۲-۲ انرژی لازم جهت تولید مواد تشکیل دهند ساختمان میکروبی ٦۱
جدول ۳-۲ کارآیی انرژی در گونه های مختلف میکروارگانیسمی ٦۱
جدول ۴-۲ اثر نوع کربوهیدرات جیره بر غلظت اسیدهای چرب. ٦۵
جدول ۵-۲ اثر سطح تغذیه بر مقدار پروتئین میکروبی تولید شده ۷۳
جدول ۶-۲ اسکلت کربنی مورد نیاز اسیدهای آمینه سنتز شده توسط باکتری ها ۷۷
جدول ۷-۲ درصد لیپولیز چربی در اقلام خوراکی ۸۳
جدول ۱-۳ منابع تامین انرژی در میکروارگانیسم ها ۹۳
جدول ۲-۳ اثر نوع خوراک بر نرخ ترقیق ۱۰۱
جدول ۳-۳ فعالیت مشارکتی باکتری های *R. flavefaciens* و *M. ruminatium* ۱۰۹
جدول ۳-۳ فرمول شیمیایی اسیدهای چرب فرار اصلی در محتویات شکمبه ۱۲٦
جدول ۴-۳ تولید متان و هیدروژن در تغییر توازن تخمیر ۱۳۱
جدول ۱-۴ یک نمونه از محیط کشت مورد نیاز جهت رشد باکتریایی ۱۵٤
جدول ۱-۵ فعالیت هضمی سلولز توسط دسته ای از انتودینومورف ها ۲۳٦
جدول ۲-۵ اثر گونه های دامی و شرایط جغرافیایی بر جمعیت و گونه های پروتوزوئری ۲٤٦
جدول ۳-۵ تاثیر میزبان بر گونه های پروتوزوئری ۲٤۸
جدول ۱-۶ تاثیر حذف گونه های قارچی از شکمبه گوسفند ۲۵۵
جدول ۲-۶ تعداد قارچ های در دستگاه گوارش گاوان ۲٦۳
جدول ۳-۶ چگونگی کاربرد تغذیه ای انواع پلی ساکارید توسط قارچ ها ۲٦۵
جدول ۴-۶ طبقه بندی قارچ ها در شکمبه ۲٦۵
جدول ۵-۶ اثر کیفیت خوراک مصرفی بر جمعیت زئوسپورها در شکمبه ۲۸۸
جدول ۶-۶ اثر هم کوشی قارچ با باکتری در حضور هگزوزها ۲۹۱

جدول ۱-۷ نمونه سطوح الگونویسی ۳۰۱
جدول ۲-۷ طراحی الگوی آماری مربع لاتین ۳۰٦
جدول ۳-۷ معادلات ارائه شده جهت الگونویسی قابلیت تجزیه پذیری مواد غذایی ۳۰۸
جدول ۴-۷ اثر رقت سازی بر کارآیی انرژی در شکمبه ۳۲۲
جدول ۵-۷ پارامترهای ارائه شده μ و φ در معادلات مختلف ارائه شده برای فرمول ۹ ۳٦۰
جدول ۶-۷ پتانسیل ردوکس در اسیدیته صفر و هفت در درجه حرارت ۳۱۱ درجه کلوین ۳٦۸
جدول ۷-۷ استاندارد $\Delta G_f°$ و $\Delta H_f°$ در متابولیت های شکمبه با °۲۹۸/۱۵ کلوین، $pH=0$ و شرایط ۱ اتمسفر ۳٦۹
جدول ۸-۷ تفاوت انرژی ارزیابی شده از پروسه های احیای شکمبه ایی بدون بررسی تغییرات ATP ۳۷۰
جدول ۹-۷ انرژی آزاد واکنش دهنده ها در شکمبه (کیلوژول بر مول) تحت حالت های شکمبه ایی ۳۷۲
جدول ۱۰-۷ محاسبه ΔG تغییر درونی اسیدهای چرب فرار از استات به پروپیونات و از استات به بوتیرات ۳۷۳
جدول ۱-۸ اثر چربی های گیاهی بر تنوع میکروبی شکمبه ۳۹۰
جدول ۲-۸ اثر بافر بر تخمیر شکمبه ای ۳۹٦
جدول ۳-۸ جنس و گونه های میکروارگانیسمی رایج جهت استفاده پروبیوتیکی ٤۰۲
جدول ۴-۸ اثر مقدار ویرجینیامایسین بر جمعیت پروتوزوئرها ٤۰۹
جدول ۵-۸ اثر عناصر سنگین بر فعالیت اوره آز باکتریایی ٤۲۳
جدول ۶-۸ مهمترین مایکوتوکسین های موجود در علوفه و مواد دانه ای ٤۲٤
جدول ۷-۸ نرخ تجزیه پذیری بعضی از مایکوتوکسین ها در شکمبه ٤۲٦
جدول ۸-۸ مقاوم سازی باکتری های رایج شکمبه به آنتی بیوتیک ها ٤۳۱
جدول ۹-۸ تعدادی ژن کلونی شده از رایج ترین میکروارگانیسم های شکمبه ٤۳۳
جدول ۱۰-۸ اثر افزودنی ها بر متان تولیدی و تولیدات تخمیری ناشی از مصرف علوفه بالا ٤۳۸

فهرست اشکال صفحه

شکل ۱-۱ میزان تقریبی جمعیت دامی براساس آمارهای سازمان خواربار و کشاورزی جهانی (FAO) ۲۲
شکل ۲-۱ انواع شاخ های موجود در نشخوارکنندگان ۲۷
شکل ۳-۱ محل و توسعه غدد بزاقی ۳۱
شکل ۴-۱ وضعیت قرارگیری اندام گوارشی براساس محل تخمیر ۳۲
شکل ۵-۱ روند تکاملی و خانواده های به جا مانده از نشخوارکنندگان واقعی ۳۳
شکل ۱-۲ محل قرار گیری ذرات غذایی براساس وزن مخصوص ٤٦
شکل ۲-۲ الگوی انتقال اسیدهای چرب فرار در سلول های اپیتلیال شکمبه ۵۲
شکل ۳-۲ راهبرد متابولیسم انرژی در شکمبه ۵۷
شکل ۴-۲: متابولیسم کربوهیدرات ها در شکمبه ٦٤
شکل ۵-۲ چگونگی جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه ٦٧
شکل ۶-۲ اثرات متقابل مواد غذایی در متابولیسم شکمبه ٦٩
شکل ۷-۲ متابولیسم پروتئین در شکمبه ۷۰
شکل ۸-۲ ارتباط بین کارآیی انرژی و نرخ انرژی به نیتروژن تولید شده در شکمبه ۷۲
شکل ۹-۲ سنتز پروتئین میکروبی ۷۵
شکل ۱۰-۲ استفاده از آمونیاک در سنتز پروتئین میکروبی ۷۷
شکل ۱۱-۲ متابولیسم چربی در شکمبه ۸۰
شکل ۱۲-۲ هیدروژناسیون اسید لینولئیک ۸۲
شکل ۱۳-۲ تاثیر سطح خوراک مصرفی بر مقدار اسیدهای چرب تولید شده در شکمبه ۸٤
شکل ۱-۳ تفاوت سلولی بین یوکاریوت ها و پروکاریوت ها ۹۲
شکل ۲-۳ منحنی سیگموئیدی رشد میکروارگانیسم ها ۹۸
شکل ۳-۳ محل قرار گیری میکروب های تخمیر کننده در دستگاه گوارش ۱۰۳
شکل ۴-۳ چگونگی اتصال باکتری ها به مواد غذایی ۱۰۸
شکل ۵-۳ روابط مشارکتی دو طرفه و رقابتی باکتری ها ۱۱۱
شکل ۶-۳ تراکم میکروارگانیسم ها قبل و بعد از خوراکدهی ۱۱۳
شکل ۷-۳ توسعه باکتری ها در شکمبه نشخوارکننده تازه متولد شده ۱۱۷

شکل ۸-۳ مراحل انقباضات شکمبه – نگاری ۱۲۱
شکل ۹-۳ تخمیر هومولاکتیک یا اکسیداسیون NAD^+ ۱۲۶
شکل ۱۰-۳ ارتباط اسیدیته شکمبه با اسیدهای چرب فرار ۱۲۷
شکل ۱۱-۳ مسیرهای تشکیل استات از دو راه اصلی اکسیدردوکتاز و فورمات ۱۲۸
شکل ۱۲-۳ تولید اسیدپروپیونیک از مسیر دی کربوکسیلیک اسید ۱۲۹
شکل ۱۳-۳ تبادل کوآنزیم NAD^+ بین سنتز اسید بوتیریک و و سنتز اسید پیروویک ۱۳۰
شکل ۱۴-۳ سنتز اسید بوتیریک توسط استواستیل کوآنزیم آ ۱۳۱
شکل ۱۵-۳ الگوی شیمیایی تخمیر پروتئین جهت سنتز اسیدهای چرب فرار و انرژی ۱۳۲
شکل ۱۶-۳ الگوی شیمیایی تخمیر و تولید گاز در شکمبه ۱۳٤
شکل ۱-۴ بخشی از شجره زیستی باکتری ها براساس طبقه بندی درختی ۱٤٥
شکل ۲-۴ اشکال مختلف باکتری های استخراج شده از شکمبه نشخوارکنندگان ۱٤٦
شکل ۳-۴ دستگاه شبیه ساز تخمیر شکمبه ۱٥٦
شکل ۴-۴ مراحل کیسه گذاری در شکمبه ۱٥۷
شکل ۵-۴ اتصال غیر تخصصی باکتری توسط غشای گلایکوکالیکس به ذرات غذایی ۱۹۲
شکل ۶-۴ الگوی فعالیتی سلولوزوم بر روی سلولز ۱۹۳
شکل ۷-۴ مخازن گوارشی ایجاد شده در سطح سلولز و همی سلولز توسط باکتری ها ۱۹۳
شکل ۸-۴ ساختمان دیواره سلولی علوفه ۱۹٤
شکل ۹-۴ ساختمان بلوری و غیربلوری سلولز ۱۹٦
شکل ۱-۵ اشکال متفاوت پروتوزوئرهای شکمبه ۲۱۱
شکل ۲-۵ ساختار تاژک و مژک در پروتوزوئرها و نحوه حرکت در آنها ۲۱۲
شکل ۳-۵ تکثیر جنسی و غیر جنسی پروتوزوئرها ۲۲۸
شکل ۴-۵ فعالیت های دهانی و ورود و خروج مواد از غشای سلول ۲۲۹
شکل ۵-۵ اتصال پروتوزوئرهای اینتستینالیس و پروستوما ۲۳۱
شکل ۶-۵ اثر پروتئین آزاد بر اتصال پروتوزوئرها به بافت های گیاهی ۲۳۱
شکل ۱-۶ اشکال مختلف قارچ ها در شکمبه ۲٥۸
شکل ۲-۶ اشکال کلونی قارچ های بی هوازی شکمبه ۲٥۹
شکل ۳-۶ چرخه زندگی در قارچ های بی هوازی شکمبه ۲۷۰

شکل ۴-۶ چگونگی رشد ساقه تندش ۲۷۲
شکل ۵-۶ تکثیر جنسی قارچ ها در شرایط نامطلوب محیطی شکمبه ۲۷۳
شکل ۶-۶ لایه های دیواره سلولی ریسه و هاگ ۲۷۷
شکل ۷-۶ اتصال قارچ به بافت گیاهی ۲۷۹
شکل ۱-۷ دیاگرام مواد مغذی باقیمانده در مدفوع بر اثر افزایش فاز تاخیر ۳۱۰
شکل ۲-۷ بخش بندی های شماتیکی جهت ارزیابی جمعیت میکروبی در شکمبه براساس راهبرد نوع اول ۳۱۲
شکل ۳-۷ تاثیر نرخ هضم و عبور بر نرخ هضم مواد مغذی ۳۱٦
شکل ۴-۷ اصول کلی طراحی الگوی تک مخزنی ۳۱۷
شکل ۵-۷ نمودار توزیع نمایی و لگاریتمی غلظت نشانگر ۳۱۸
شکل ۶-۷ نمودار بارباراکسل و لگاریتمی غلظت نشانگر ۳۱۸
شکل ۷-۷ اصول کلی طراحی الگوی دو مخزنی ۳۱۹
شکل ۸-۷ اصول کلی طراحی الگوی دو مخزنی در بخش شکمبه ۳۱۹
شکل ۹-۷ اصول کلی طراحی الگوی دو مخزنی با یک مخزن اضافه غیرقابل دسترس در بخش شکمبه ۳۱۹
شکل ۱۰-۷ نمودار معادله بلاکستر و گرووم ۳۲۱
شکل ۱۱-۷ الگوی هضم فیبر ۳۲۳
شکل ۱۲-۷ الگوی حداقلی هضم فیبر در شکمبه ۳۲٤
شکل ۱۳-۷ الگوی ماندگاری انتخابی هضم فیبر در شکمبه ۳۲٦
شکل ۱۴-۷ الگوی تاخیری هضم فیبر در شکمبه ۳۲۷
شکل ۱۵-۷ الگوی ورود مواد مغذی در مسیر تولید اسیدهای چرب فرار ۳۲۹
شکل ۱۶-۷ الگوی BA موثر بر تولید اسیدهای چرب فرار ۳۳۱
شکل ۱۷-۷ الگوی DA موثر بر تولید اسیدهای چرب فرار ۳۳۱
شکل ۱۸-۷ الگوی DI موثر بر تولید اسیدهای چرب فرار ۳۳۳
شکل ۱۹-۷ الگوی ساده شده غیر خطی وظایف قطعی شکمبه با متغیرهای ثابت ۳۳۵
شکل ۲۰-۷ تاثیر اسیدیته بر نوع اسیدهای چرب فرار تولید شده از مواد مغذی خاص ۳٤۱
شکل ۲۱-۷ الگوی ورود مواد نیتروژن دار در مسیر متابولیسم پروتئین ۳٤۳
شکل ۲۲-۷ الگوی ورود مواد اسید چرب به شکمبه ۳٥۲

شکل ۲۳-۷ الگوی بیوهیدروژناسیون اسید چرب در شکمبه ۳۵٤
شکل ۲۴-۷ تغییر حالت اسید و باز شکمبه براساس قابلیت کنترل یونی ۳۵٦
شکل ۲۵-۷ سه مخزن قابل بررسی *In vitro* در تولید گاز ۳۵۸
شکل ۲۶-۷ الگوی ترمودینامیکی ساده شده Fo براساس مسیرهای تخمیری در شکمبه ۳٦٦
شکل ۱-۸ نمونه ای از الگوی دستکاری در تخمیر کربوهیدرات ۳۸٦
شکل ۲-۸ الگوی دستکاری در تخمیر نیتروژن ۳۸۸
شکل ۳-۸ ارتباط بین ساختار کربوهیدرات ماده خوراکی، اسیدیته و تنوع میکروبی ۳۹۳
شکل ۴-۸ اثر موننسین بر فعالیت های دیواره سلولی میکروارگانیسم ها ۳۹۹
شکل ۵-۸ اثر آنزیم قارچ های هوازی بر تجزیه لیگنین در شکمبه ٤۰۵
شکل ۶-۸ اصول دستکاری ژنتیکی میکروب ها ٤۳۱

فصل اول

علف خواران و نشخوارکنندگان

۱-۱ رده بندی علف خواران ۲۳

۱-۲ تغییرات ساختاری و عادت پذیری علف خواران ۲۶

۱-۳ تفاوت ساختاری دستگاه گوارش علف خواران ۲۹

۱-۴ نشخوارکنندگان و توسعه معده چند قسمتی ۳۳

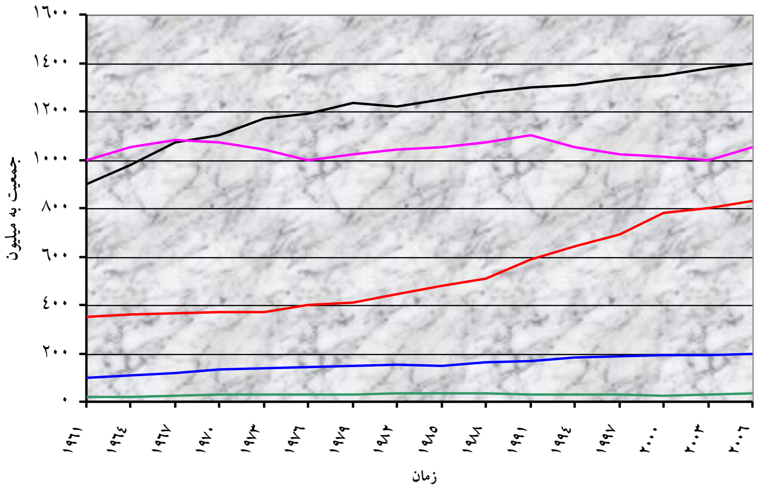
۱-۵ جهت مطالعه بیشتر ۳۹

علف خواران و نشخوارکنندگان

مطالعه حیوانات علف خوار به خصوص دسته نشخوارکنندگان می تواند یکی از مهمترین و پیچیده ترین علوم طبیعی را برای اشخاص در سطح علوم آزمایشگاهی حرفه ای، تجاری و صنعتی فراهم نماید. تفاوت گونه های جانوری و گیاهی قابل مصرف در این دسته از موجودات می تواند زمینه تحقیقات بیشماری را در تغذیه و رفتارهای مصرفی ایجاد نماید. تنوع این دسته از موجودات به دلیل تنوع شرایط آب و هوایی و گیاهی در هر منطقه سبب شده است علوم مربوط به آنها دائما در حال تغییر و دگرگونی باشد. البته این دگرگونی به شکل و اندازه دام ها که خود تابعی از نوع و توزیع گیاهی در منطقه می باشد، وابسته است.

با توجه به اطلاعات بدست آمده از گروه های باستان شناسی و سایر گروه های تحقیقی می توان گفت که تقریبا مهمترین گروه های علفخوار یعنی نشخوارکنندگان بیشتر مورد نیاز بشر بوده و همواره در طول تاریخ با انسان زندگی کرده است. تنوع نشخوارکنندگان مورد استفاده انسان براساس نوع شرایط آب و هوایی، تنوع گیاهی و توپوگرافی منطقه مورد استفاده متغیر است. علت اهمیت گروه علفخواران به خصوص نشخوارکنندگان را می توان در تولیدات آنها از مواد کم مصرف برای انسان دانست که مستقیما از زنجیره اول غذایی تامین می گردد.

طبق مدارک بدست آمده از حفاری های باستان شناسی مشخص شده است که تنوع گونه های موجود رایج که با شرایط آب و هوایی منطبق جدید گشته اند، نسبت به تعداد گونه های سابق دوره های مختلف زمین شناسی کمتر می باشد. اما تعداد موجودات در این گونه ها به دلیل رفع احتیاجات آدمی در مناطق مختلف گسترش بالاتری پیدا کرده اند. همچنین طبق نظریه های ارائه شده جمعیت نشخوارکنندگان و کیفیت تولیدات آنها از سایر دوره ها بیشتر می باشد (شکل۱-۱). می توان با قطعیت فراوان گفت که بیش از ۵۰۰ هزار سال است که نشخوارکنندگان توسط انسان ها شکار می شوند. اما وجود نشخوارکنندگان و فعالیت آنها در کنار انسان سبب قدرت و پویایی جوامع بشری می شده است. انسان ها برای استفاده بیشتر و دائمی از دام ها به اهلی کردن نشخوارکنندگان روی آورده اند. در بین نشخوارکنندگان گوسفند اولین موجودی است که در ۱۱ هزار سال پیش وارد جوامع بشری شد. سپس بز در ۹۵۰۰ سال و گاو در ۸۵۰۰ سال پیش اهلی گردیدند. اما چگونگی اهلی شدن این موجودات همچنان با ابهاماتی روبرو است که عده ایی معتقدند این امر ناگهانی و در ارتباط با توسعه زراعت و در پی عصر یخبندان بوده است.



شکل ۱-۱ میزان تقریبی جمعیت دامی براساس آمارهای سازمان خواربار و کشاورزی جهانی (FAO). خط سیاه جمعیت گاوها، خط صورتی جمعیت گوسفندان، خط قرمز جمعیت بزها، خط آبی جمعیت بوفالوها و خط سبز جمعیت شترها را نشان می دهد.

با وجود پیشرفت های چشمگیر علم و صنعت می توان به جرائت گفت نیاز انسان به این دسته از موجودات جهت تامین خوراک و برخی از فاکتورهای صنعتی بیشتر شده است. اهمیت این موضوع باعث شد که سرشماری منطقه ایی و جهانی برای دام ها در نظر گرفته شود تا میزان رشد جمعیت دام ها مشخص گردد (جدول ۱-۱). در زمان های گذشته تقریبا تنها منبع غذایی نشخوارکنندگان علوفه و فیبر خوراک های برداشت شده از مزارع بوده است.

جدول ۱-۱ آمار جمعیت دام در ایران و جهان.

سال	ایران			جهان
	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۲۰۰۷
گوسفند	۵۲۲۱۹	۵۲۲۷۱	۵۲۳۰۰	بیش از یک میلیارد
گاو	۷۸۱۹	۷۸۹۲	۷۹۸۹	بیش از یک و نیم میلیارد
بز	۲۵۸۰۷	۲۵۸۳۳	۲۵۸۳۳	بیش از هشتصد میلیون
گاومیش	۴۱۳	۴۲۴	۴۳۵	بیش از دویست میلیون
شتر	۱۵۱	۱۵۲	۱۵۲	بیش از ۳۰ میلیون

واحد: هزار راس- هزار نفر

منبع: سازمان خواربار و کشاورزی FAO.

اما امروزه (در ۱۰۰ سال اخیر) به دلیل افزایش احتیاجات غذایی در جهان، برای بیشتر شدن تولیدات دامی، دامداران مجبور به افزایش توان تولیدی دام ها بوسیله اصلاح نژاد و تغذیه آنها علاوه بر علوفه و

ضایعات کشاورزی با غلات و خوراک های متراکم شده اند. این تغییر در عادات غذایی تاثیر شگرفی بر مقدار تولید دام ها، ارزش کالای تولیدی آنها و هضم و جذب مواد غذایی در دستگاه گوارشی نشخوارکنندگان داشته است. با این وجود پرسش هایی مطرح است که براساس اهمیت و اعتبار این دسته از دام ها چه رخدادی در آینده انتظار آنها را می کشد؟ نحوه استفاده از دام ها و تغییرات ساختاری آنها چگونه خواهد بود؟ آیا تعداد دام ها کاهش یا افزایش خواهد یافت و یا تولیدات آنها براساس کمیتشان تغییر خواهد کرد؟ این سوالات و دهها سوال دیگر همواره مورد پرسش متخصصین دام و طیور بوده است. متولیان در این امر معتقدند که دام ها براساس کاهش منابع اولیه ناچارا دچار تغییرات اصلاح نژادی شده و باید قدرت هضم و جذب مواد غیر متعارف در آنها افزایش یابد تا مقدار تولیدات دام ها برای رفع احتیاجات آدمی کاهش نیابد. کاهش تعداد دام و افزایش تولیدات آنها از مهمترین دستاوردهای است که بشر امروزی همواره به فکر آن می باشد. خسارت های ناشی از ورود متان به اتمسفر و افزایش نیترات خاک و دهها معضل دیگر باعث شده است که متخصصین سعی بر تولید دام های اصلاح شده نمایند و عادات غذایی همراه با نوع هضم - جذب مواد غذایی را در آنها تغییر دهند.

۱-۱ رده بندی علف خواران

برای اینکه بتوان بررسی های ساده تری در جهت امکان تغییرات اصلاح نژادی انجام داد و نحوه تغییر عادات غذایی دام ها را مشخص کرد، لازم است ابتدا شناختی از روند تکاملی و طبقه بندی آنها در بین سایر موجودات بدست آورد. این طبقه بندی سبب مشخص شدن برنامه تحقیقاتی جهت شناسایی تمام فاکتورهای حیاتی زیستی جانوران می شود. طبقه بندی ها می تواند براساس روند تکاملی عناصر ژنتیکی، عادات غذایی و سایر مواد باشد. رایج ترین نوع طبقه بندی حیوانات براساس روند تکاملی عناصر ژنتیکی بوده که شامل:

سلسله (Kingdom): حیوانات (Animal)

شاخه (Phylum): طنابداران (Cordata)

رده (Class): پستانداران (Mammals)

زیر رده (Subclass): سم داران (Ungulata)

راسته (Order): زوج سمان (Artiodactyla)

زیر راسته (Suborder): نشخوارکنندگان واقعی (Pecora) و جانورانی با سم های گوشتالود (Tylopoda)

درون زیر راسته نشخوارکنندگان واقعی (Ruminanttrue) شش خانواده طبقه بندی می شود. شامل:

آهوسانان (Trgulidae): شامل سه جنس (Genus) با چهار گونه (Species) هستند و دارای معده سه قسمتی همراه با فقدان دندان ثنایای بالایی و جویدنی آرام و با تعمق می باشند.

گوزن سانان (Cervidae): دارای ۱۷ جنس با ۴۱ گونه می باشند که براساس نوع شاخ طبقه بندی می شوند که بعضی از گونه های آنها دارای دندان های تیز و برنده و توسعه یافته هستند.

گاوسانان (Bovidae): شامل ۴۹ جنس با ۱۴۰ گونه می باشند که این خانواده دارای استخوانهای توسعه یافته با معده های چهار قسمتی می باشند. شاخ در این گونه ها وجود دارد.

زرافه سانان (Giraffidae): دارای دو جنس با دو گونه می باشند. این گونه ها دارای شاخ های کوتاه که گاه با پوست پوشانده شده است.

Antilocapridae: شامل یک جنس با یک گونه می باشد. در این خانواده مباحث زیادی ادامه دارد و عده ای آن را جزء خانواده گاوسانان می دانند.

Muschidae: شامل یک جنس با پنج گونه می باشد. آهوی خوش بو از این خانواده محسوب می شود.

درون زیر راسته سم داران گوشتالود (Tylopoda) یک خانواده طبقه بندی می شود که شامل:

شترسانان (Camelidae): شامل سه جنس با شش گونه هستند که بر روی پاهایی که دارای بالشتک های گوشتالود می باشند، حرکت می کنند. سم ها در این گونه از جانوران بیشتر شبیه ناخن دیده می شود و دارای معده سه قسمتی هستند.

طبقه بندی دیگری توسط هافمن (Hofmann) و ون سوست (Van Soest) برای تقسیم بندی نشخوارکنندگان ارائه گردید که براساس عادات غذایی دام ها بنیان گذاری شده است. بعد از مدتی این طبقه بندی توسط چرچ (Church) و همکاران تصحیح و پذیرفته تر شد. اما این طبقه بندی که براساس میوه یا سر شاخه خواری، خوراک های علوفه ایی حجیم و خوراک های حد واسط مانند ریشه یا بوته خواری صورت گرفته است، کمتر مورد استفاده قرار می گیرد. به طور مثال:

۱. نشخوارکنندگان میوه و سر شاخه خوار: غزال ها، گوزن ها، زرافه

۲. نشخوارکنندگان واسط بوته خوار: گوسفند، انواع بز، گوزن های شمالی، ایمپالا

۳. نشخوارکنندگان علوفه خوار: گاوها، شتران، بوفالوها

در این طبقه بندی باید عواملی مانند فصل و شرایط آب و هوایی را که تاثیر بسزایی در میزان و نوع مصرف خوراک بر گیاه خواران (بخصوص نشخوارکنندگان) دارد، در نظر گرفت تا صحت مطالعات افزایش یابد. در شرایط نامطلوب برای ادامه حیات تمامی نشخوارکنندگان از تمامی علوفه ها و سایر گیاهان قابل دسترس استفاده می کنند.

نوع خوراک مصرفی بطور طبیعی بر مدت زمان مصرف و مقدار خوراک اثر بسزایی دارد. به طور مثال؛ مدت زمان خوراک مصرفی در حیوانات سرشاخه خوار کم اما تعداد دفعات مصرف خوراک در آنها زیاد می باشد. و بالعکس حیوانات حجیم خوار مانند گاوها مدت زمان مصرف بالایی داشته ولی تعداد دفعات مصرف خوراک در آنها کم می باشد. این تفاوت ناشی از نوع خوراک مصرفی و ساختار دستگاه گوارشی آنها است، که بر نوع گونه میکروبی و تخمیر آنها در شکمبه اثر فراوانی خواهد داشت. کارلوس لینائوس (Carolus Linnaeus) برای اولین بار خانواده گاوسانان را طبقه بندی و آن را به سه گونه مجزا تقسیم نمود. وی گونه های مزبور را به بوس تاروس ها (*Bos taurus*) شامل نژادهای اروپایی و نژاد آمیخته آسیایی - آفریقایی، بوس اینديکوس ها (*Bos indicus*) شامل دو نژاد آسیایی و آفریقایی و بوس پریمیجنیوس (*Bos primigenius*) شامل نژادهای وحشی اروپایی که مخلوطی از دو گونه قبلی می باشد، تقسیم بندی کرد. اگر چه امروزه این طبقه بندی تغییر یافته و سه گونه جدید اضافه شده است، اما مبنای طبقه بندی تقریبا به همان صورت سابق می باشد. سه گونه جدید ارائه شده: *Bos primigenius taurus*، *Bosprimigenius indicus*، *Bos primigenius primigenius* است. باید در نظر داشت که گاوها منحصر به ۶ گونه فوق نمی باشد و طبقه بندی آنها امروزه بسیار پیچیده تر صورت می گیرد. زیرا هیبریدها و گونه های خاصی هستند که از این قاعده تبعیت نمی کنند ولی جزء گاوسانان طبقه بندی می شوند. بطور مثال؛ یاک های مستقر در ارتفاعات تبت، گاوهای وحشی در جنوب آسیا با نام محلی *Banteng*، گاوهای وحشی کوهان دار آمریکایی (*Bison*) و یا نژاد هیبرید *DwarfLulu* موجود در نپال که از ترکیب یاک ها با نژاد بوس تاروس ها همراه با بوس اینديکوس ها حاصل شده است، از این موارد محسوب می شوند.

علت اصلی ضعف یا پیچیده شدن طبقه بندی گاوها گسترده شدن نواحی مورد زندگی آنها و آمیختگی گونه های مختلف آن که همگی توسط انسان صورت گرفته است، می باشد. بطور مثال امروزه قلمرو گسترش گاوهای نژاد پریمیجنیوس از نواحی اروپا به بخش های شمال آفریقا و قسمت بزرگی از آسیا کشیده شده است. در حالی که در طی روند تکاملی این نژاد فقط در اروپا یافت می شد.

۲-۱ تغییرات ساختاری و عادت پذیری علف خواران

توسعه و تغییرات دستگاه گوارش و سایر اندام ها در حیوانات علف خوار و به خصوص نشخوارکنندگان وابسته به شرایط اقلیمی منطقه می باشد. شرایط اقلیمی به واسط نوع آب و هوا، تاثیر فراوانی بر نوع پوشش و کیفیت ساختمانی گیاه دارد. این عامل و شرایط زمین شناسی منطقه مانند پستی و بلندی ها و شکل ظاهری زمین بر شکل و ساختار بدن دام ها و عادات غذایی آنها در طول دوره تکامل نقش بسزایی داشته است.

۱-۲-۱ تغییرات ریخت شناسی

براساس اکتشافات انجام شده در زمینه باستان شناسی محققین بر این باورند که گاوها براساس گذشت زمان دارای تغییرات گسترده ایی شده اند. این تغییرات تدریجی در طول زمان سبب گشته بتوانند پراکنش وسیعی حتی در مناطق سردسیری مانند نواحی سیبری، ارتفاعات هیمالیا، کویرهای خشک و سوزان داشته باشند. تغییرات ظاهری گاوها را می تواند در سه عامل کلی شامل اندازه بدن، شکل و وجود زوائد در بدن، پوشش و تقریبا رنگ بدن بیان گردد. این موارد همواره دستخوش تغییر عواملی مانند شرایط جوی، عوارض زمین و پراکنش گیاهی می باشند. لذا در آینده هم می توانند دچار تغییرات اساسی شوند.

اولین فاکتوری که در ریخت شناسی نشخوارکنندگان واقعی به خصوص گاوسانان مورد بررسی قرار گرفته است وجود زائده شاخ می باشد. اگرچه نمی توان در این کتاب به بیان تفاوت های اساسی شاخ در نشخوارکنندگان پرداخت. اما، تفاوت در شکل و توسعه شاخ سبب شده است که جانورشناسان بتوانند نشخوارکنندگان را بر این روش به سه گروه کلی طبقه بندی کنند. طبقه اول دسته ایی از نشخوارکنندگان (گاوسانان و آهوسانان) هستند، که دارای شاخ های مشخص و بدون انشعاب و گاهی هم پیچ خورده می باشند. طبقه دوم دسته گوزن سانان هستند که دارای شاخ های گسترده و چند قسمتی می باشند. و دسته آخر شترسانان و زرافه سانان بوده که فاقد شاخ می باشند و یا در صورت وجود شاخ در زرافه سانان، شاخ آنها زیر پوستی محسوب می شود (شکل ۲-۱). اما وجود شاخ در گاوسانان به سه بخش عمده تقسیم و مورد بررسی قرار می گیرد. گروه اول شاخ هایی هستند که به حالت پهن بر روی جمجمه دیده می شوند. این شاخ ها تقریبا مسطح و به سمت جوانب دام رشد می کنند. گروه دوم شاخ هایی هستند که باریک بوده و براساس نوع پیچش آنها به سمت داخل و یا خارج تقسیم می شوند. و در آخر دام هایی که فاقد شاخ می باشند.

شکل ۲-۱ انواع شاخ های موجود در نشخوارکنندگان.

دومین فاکتور مورد بررسی در زوائد بدنی وجود کوهان است که براساس شرایط آب و هوایی بسیار متغیر دیده می شود. وجود آب و هوای متغیر مانند اقلیم خشک و سوزان و یا سردسیری از عوامل اصلی بوجود آمدن زوائد در بدن دام ها مانند کوهان و یا غبغب می باشد. این زوائد می تواند هم به عنوان منبع غذایی در زمان های نامطلوب مورد مصرف قرار گیرند و هم سبب کنترل درجه حرارت بدن با افزایش یا کاهش سطح تماس بدن با محیط گردد.

سومین فاکتوری که در بررسی های ریخت شناسی مورد ارزیابی قرار می گیرد پوشش و رنگ بدن دام ها می باشد. نوع پوشش تحت تاثیر شرایط آب و هوایی متغیر بوده و گاه براساس فصل نیز تغییر می کند. با این وجود تغییرات پوششی پوست در طول زمان وابسته به جنس، گونه دام و محل زندگی آنها می باشد. به طور مثال؛ گاوهای ناحیه تبت و یا مناطق سردسیری سیبری در طول زمان به جای موهای کوتاه دارای کرک ها یا موهای بلندی شده اند که می تواند سبب افتراق آنها از سایر گاوها شود.

۱-۲-۲ تغییرات ساختمانی بدن

تغییرات وضعیت ساختمانی بدن همواره در طول دوران تکاملی شکل گرفته است. طبق نظر عده ای از کارشناسان تغییرات پوشش گیاهی، شرایط آب و هوایی منطقه و کاهش یا افزایش فراوانی خوراک در دسترس می تواند در تغییرات ساختمانی یک گونه اثر بسزایی داشته باشد. اگر چه تحقیقات در زمینه تغییرات دستگاه گوارش حیوانات گیاه خوار به خصوص نشخوارکنندگان کم صورت گرفته است، اما اندک تحقیقات در این زمینه نشان می دهد که کیفیت خوراک مصرفی در طول دوران تکاملی و همچنین در طول یک سال بیشترین اثر را بر روی تغییرات دستگاه گوارش خواهد داشت.

نوع غذا خوردن گیاه خواران و تعداد دفعات غذا خورن آنها هم تابع کیفیت خوراک می باشد. هر چه میزان کیفیت خوراک از حالت گیاه تازه و جوان به گیاهان خشبی تر متمایل گردد، تغییرات ساختمانی دستگاه گوارش از حالت تک معده ایی در تک سمی ها به دو، سه و یا چهار قسمتی در گاوها تغییر می نماید. این تغییر تنها به معنای حذف یک فضا یا بخش گوارشی از معده نیست بلکه گاه

به معنای تحلیل رفتن و ناچیز شدن بخشی از فضای معده می باشد. به طور مثال؛ تحلیل فضای هـزارلا در آهوسانان (معده سه قسمتی) که در شرایط سخت آب و هوایی فعالیت واقعی خود را نشـان خواهـد داد، از آن دسته خواهد بود. تغییر در ساختمان دستگاه گوارش سبب تغییر نوع عادت غذایی و تعداد دفعـات غذا خوردن در طول روز هم می شود.

تغییرات در وضعیت ساختمانی دستگاه گوارش تنها به نوع وضعیت ظـاهری معـده و نحـوه خـوردن غذا منتج نمی شود، بلکه تغییر در اندازه، مقدار و نـوع ترشـحات غـدد بـرون ریـز، کـوچکی و بزرگـی وضعیت فضای دهانی و فک ها، وضعیت ظـاهری و ترشـحی زبـان، طـول دسـتگاه گـوارش و وضـعیت ظاهری سطح جذب دستگاه، نوع و درصد تشکیل دهندگی عضلات صاف یا حلقوی دستگاه گوارش و وضعیت ساختمانی دستگاه بویایی هم براساس نوع کیفیت خوراک از دیگر تغییرات تکاملی سـاختمانی قابل اشاره می باشد. به طور مثال؛ تغییر نوع عادت غذایی و کیفیت خـوراک از حالـت متـراکم خـواری مانند برگ های جوان و علوفه های تازه به خشـبی خـواری سـبب کـاهش پـاپیلی هـا (برجسـتگی هـای انگشتی موجود در شکمبه) و در نتیجه کاهش سطح جذب مواد غذایی در شکمبه می شود.

از طرف دیگر، عده ایی از کارشناسان نشان دادند که تغییر نـوع پوشـش گیـاهی و کیفیـت آنهـا در طول سال سبب تغییر اندک وضعیت دستگاه گوارش مـی شـود. یعنـی دام هـایی کـه در حالـت طبیعـی مشغول به چریدن هستند، نحوه مصرف خوراک در آنها از فصل تابستان تا زمستان متفـاوت مـی گـردد. آزمایشات نشان می دهد این تغییرات به مقدار مصرف و اندازه سایز معده ارتباط پیدا می کنـد. بـه طـور مثال، در فصل بهار و تابستان در مناطق معتدله دستگاه گوارش گیاه خواران در بخش معـده کـوچکتر و تعداد دفعات مصرف خوراک در آنها بیشتر می گردد. این عامل سبب می شـود کـه دام دائمـا از علوفـه تازه استفاده و انرژی از دست رفته خود را بدست آورد. از طـرف دیگـر بـه دلیـل کیفیـت بـالای علوفـه قدرت تجزیه پذیری آنها سریعتر و سرعت عبور از معده بیشتر می شود، لذا معده می تواند وضعیت جمع تری از گذشته داشته باشد. این در حالی است که در فصل زمستان به دلیل کیفیت نامناسـب علوفـه لازم است که علوفه مدت زمان بیشتری در معده توقف نموده تا تجزیه گردد. این عامل باعـث مـی شـود کـه وضعیت معده بزرگتر و کشیده تر مشاهده شود. همچنین حیوانات برای گرم نگاه داشتن بدن خود ملـزم به انباشته کردن علوفه در معده خود شده تا بر اثر تجزیه حرارت بیشتری در بدن تولید نمایند.

۳-۲-۱ تغییرات رفتاری

کارشناسان علوم زیستی بر این باورند که موجـودات براسـاس تغییـرات شـرایط محیطـی، رفتارهـای متفاوتی از خود نشان می دهند. این رفتارها می تواند ناشی از تغییر محل زندگی جاندار (از اقلیم گرم به

سرد و بالعکس و یا از حالت مسطح به کوهستانی و بالعکس) و یا تغییر کمی و کیفی خوراک آنها باشد. گیاه خواران به خصوص حیواناتی با معده چند قسمتی مانند گاوها از این شرایط مستثنی نبوده است. اما به دلیل صنعتی شدن نگهداری این دسته از دام ها تغییرات رفتاری در آنها کمتر دیده می شود و دارای رفتارهای مشابه شده اند. اما در صورت دقت در امور رفتاری دام ها می توان به اثر خوراک و فصل بر رفتار ارائه شده پی برد. به طور مثال؛ کاهش مقدار نشستن، افزایش مدت زمان ایستادن و یا افزایش مدت زمان نشخوار از این گونه تغییر رفتارها می باشد.

اما اهمیت شناسایی تغییرات رفتاری چه سودی دارد؟ با این روش می توان علاوه بر تحقیق و جستجوی بهتر در زمینه تغییرات تکاملی موجودات، پی به چگونگی برخورد با رفتارهای نوین و تشخیص صحیح تر آنها پی برد. بروز رفتارهای یکسان نشخوارکنندگان در مقابل یک تغییر در نقاط مختلف می تواند ما را در چگونگی گسترش آنها یاری رساند. کنش های متفاوت و یکسان گیاه خواران به خصوص نشخوارکنندگان در مقابل مصرف یک گونه گیاهی سبب شناسایی راه های جدیدتر جهت افزایش تجزیه پذیری آن گونه گیاهی می شود. به طور مثال؛ مقاومت تغذیه ایی دسته ای از دام های نواحی جنوب کشور به مصرف گیاهان چوبی شده (غنی از لیگنین) و تجزیه پذیری مناسب تر آنها این انگیزه را برای کارشناسان تغذیه فراهم آورده است که این نوع مقاومت را به سایر دام ها براساس تغییر گونه میکروبی شکمبه و یا انتقال ارثی افزایش دهند. در این رابط باید رفتارهای مصرف خوراک توسط دام های نواحی جنوب کشور شناسایی و عوارض آشکار شدن آن را بر سایر دام ها بررسی نمود. تا از اختلال در تولید برای نسل های آینده جلوگیری شود.

۳-۱ تفاوت ساختاری دستگاه گوارش علف خواران

برای بررسی و شناسایی دقیق تر اندام های گوارشی لازم است دستگاه مزبور را در ابتدا تقسیم بندی نمود. این تقسیم بندی براساس شباهت ساختمانی و یا شباهت کاری صورت نمی گیرد. بلکه تنها براساس جایگاه قرار گیری آن در بدن می باشد. بدین ترتیب چهار تقسیم بندی در این دستگاه دیده می شود که شامل: ۱) بخش فوقانی دستگاه شامل بخش دهانی و غدد ترشحی آن، ۲) بخش ابتدایی شامل مری و معده، ۳) بخش میانی شامل روده کوچک و غدد آن و ۴) بخش انتهایی شامل روده بزرگ و مقعد می باشد. در این بخش به جای صحبت درباره مشخصات هر بخش به تمایزات اساسی و اصلی دستگاه گوارش در بین گیاه خواران می پردازیم. لذا مهمترین تمایزات عبارتند از:

۱-۳-۱ تفاوت در وضعیت دهانی

یکی از مهمترین عوامل اصلی افتراق در نحوه چریدن دام ها وضعیت دهـان، فـک، دنـدان، فضـای دهانی، لبها و زبان آنها می باشد. این عامل سبب شده است که علف خواران به سه بخش خشبی خـوار، سرشاخه خوار و بوته خوار تقسیم شوند. دسته ای از علف خواران به دلیل داشتن فضای دهـانی کشـیده، لبهای حساس و متحرک و وجود دندان در فک بـالا مـی تواننـد مبـادرت بـه خـوردن بـرگ هـای ریـز درختان و علف های تازه درآمده با ارتفاع کم از سـطح زمـین نماینـد و انتخـاب گـران اولیـه محسـوب شوند. گوسفند و بز دو نمونه مشخص از این دسته حیوانات هستند. اما علف خوارانی کـه دارای فضـای دهانی گسترده و فقدان دندان در ناحیه پیشین فک بالا بوده و لبهای کم تحرک تری دارند، مـی تواننـد خوراک های حجیم و بلند قد را بهتـر مصـرف نماینـد کـه گاوهـا، بوفالوهـا و گـوزن هـا از ایـن دسـته محسوب می شوند. بین این دو دسته می توان براساس نوع دندان، فضای دهانی کشیده یا گسـترده طبقـه بندی مختلفی انجام داد. اما زبان هم می تواند در این تفاوت ها نقش اساسی بـازی کنـد. بـه طـور مثـال؛ زبان علف خواران خشبی خوار مانند گاو، بوفالو و دسته ای از گوزن ها گوشتالود، بـزرگ و در هنگـام مصرف غذا به صورت یک میله پیستون عمل می کند. همچنین، زبان در هنگام جمـع آوری غـذا عضـو مهم و حساس محسوب شده و به صورت یک حلقه به دور خوراک پیچیده و آن را به دهان انتقـال مـی دهد. اما زبان حیوانات انتخاب گر سرشاخه خوار قلمی، باریک و در هنگام مصرف غذا به صورت یک عقربک ترازو عمل می نماید. سایر علف خواران براساس نوع زبان و خوراکشان بین این دو طبقه بنـدی می شوند.

متفاوت بودن نوع زبان و حرکت آن سبب بروز تفاوت در میزان و نوع پرزهای چشایی و حساسـیت دام به نوع خوراک شده است. زبان های بزرگ و گوشتالود دارای پرزهای چشـایی پهـن تـر و زبرتـری شده اند و این باعث می شود که دام به طعم (به دلیل بزرگی پرزهـا و تعـداد کـم آن هـا بـر روی زبـان، حساسیت به طعم کاهش یافته است) و خشکی خوراک حساسیت کمتری نشان دهد و طیـف وسـیعتری از خوراک ها را مصرف کند.

۲–۳–۱ تفاوت در غدد ترشحی

غدد بزاقی و گوارشی بیشترین تغییرات را براساس نوع خوراک مصـرفی در بـین علـف خـواران بـه خصوص نشخوارکنندگان خواهند داشت (شکل ۳–۱). حیواناتی که مبادرت به مصرف خوراک متراکم (سرشاخه خواری) می کنند، توسعه غدد بزاقی آنها ۰/۳ درصد از کل وزن بدن را شامل می شوند که هر چه به سمت خشبی خواری متمایل می شوند مقـدار آن کـاهش و بـه ۰/۰۶ درصـد تنـزل مـی یابـد. ایـن کاهش می تواند صرفا به دلیل کم اهمیت تر شدن هضم خوراک توسـط غـدد بزاقـی و افـزایش تجزیـه

پذیری غذا توسط تخمیر در شکمبه باشد. غدد بناگوشی و تحت فکی از دام های سرشاخه خوار به دام های خشبی خوار کوچکتر می شود. اما غدد زیر زبانی در این روند افزایش وزن و حجم می یابند تا قدرت جویدن و فرو بردن خوراک از مری به دلیل ترشحات موکوسی ساده تر صورت گیرد. این حالت سبب می شود که کیفیت ترشح بزاق تغییر و محیط برای تخمیر شکمبه براساس نوع خوراک مصرفی متفاوت شود. البته باید عنوان کرد که ۴۰ تا ۵۰ درصد بزاق از غده بناگوشی ترشح شده و ترشحات آن قدرت بافری بالاتری را نشان می دهد. اما کیفیت بزاق تابع سه شرط اصلی نوع خوراک، نشخوار و مدت زمان استراحت دارد.

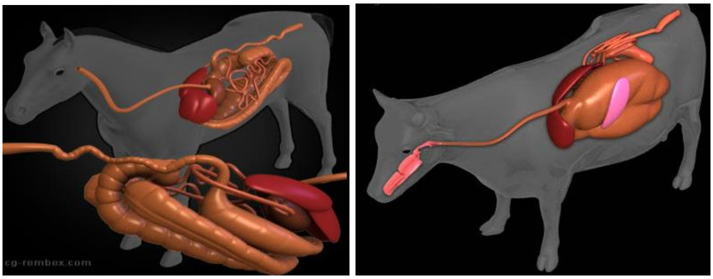
شکل ۳-۱ محل و توسعه غدد بزاقی. کادر با هاشور یک طرفه غدد بناگوشی، کادر با هاشور ضربدری غدد تحت فکی و کادر با هاشور نقطه ای غدد زیر زبانی را نشان می دهد.

کیفیت و نوع ترشحات گوارشی متاثر از کیفیت خوراک مصرفی بوده و در بین علف خواران می تواند متفاوت باشد. اما این تنوع بیش از حد در ترشحات گوارشی (در بین علف خواران) مربوط به فرآیندهای تخمیر ناشی از میکروارگانیسم ها است و در اکثر موارد به دام ارتباط چندانی پیدا نمی کند. اندک اختلاف باقی مانده در دستگاه گوارش می تواند ناشی از پایه ژنتیکی (مانند قدرت هضم لاکتوز توسط لاکتاز در بعضی دام ها) و یا اکتساب از محیط (مانند هضم گیاه میموزا توسط بزها و یا هضم اکالیپتوس توسط کوآلاها) باشد. جایگاه فعالیت های تخمیری در دام ها می تواند محل ترشحات گوارشی را از یک دام به دام دیگر متفاوت کند. به طور مثال؛ به دلیل وجود فرآیند تخمیر در بخش پیشین دستگاه گوارش گاوها نسبت به اسب ها که در بخش انتهایی بیشتر صورت می گیرد، مکان و مقدار فعالیت های گوارشی در ناحیه دوازده متفاوت می گردد. و همچنین نوع ترشحات معده واقعی و مقدار آن در بین حیوانات علف خوار تک معده ای با نشخوارکنندگان به دلیل وجود فرآیند تخمیر متفاوت است.

۳-۳-۱ تفاوت در شکل ظاهری و کارآیی دستگاه گوارشی

کارآیی دستگاه گوارش با شکل دستگاه ارتباط تنگاتنگی دارد و تقریبا از هم تفکیک ناپذیر می باشند. این دو عامل می توانند با هم سبب افتراق اساسی علف خواران گردند. بین گیاه خوارانی که

تخمیر در بخش پیشین دستگاه گوارش صورت می گیرد با آنهایی که تخمیر در بخش انتهـایی دسـتگاه گوارش انجام می شود تفاوت های آشکار و اساسی دیده می شود (شکل ۴-۱). این تفاوت سبب بـروز انواع رفتارهای مصرف خوراک شده است. حیواناتی که تخمیر آنها در بخش ابتدایی دسـتگاه گـوارش می باشد، دارای معده های چند قسمتی بوده و قدرت بازگشت خوراک به دهـان را پیـدا نمـوده انـد. در این حالت مجرای مرئی چنان تخصص یافته عمل می کند که می تواند مقدار خوراک را از معده کاذب (شکمبه) دریافت و به دهان بازگرداند. در این حالت معده می تواند بیشتر به صورت سه یا چهار قسـمتی دیده شود.



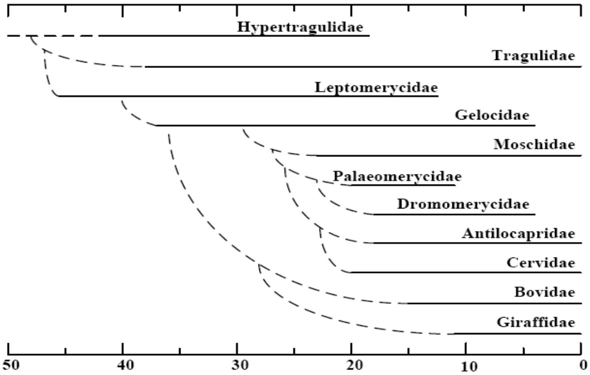
شکل ٤-١ وضعیت قرارگیری اندام گوارشی براساس محل تخمیر در گاو (سمت راست) و اسب (سمت چپ).

در معده های چند قسمتی دامنه گیاهی برای تغذیه حیوانات و دام هـا بسـیار گسـترده تـر مـی باشـد. قدرت سم زدایی در این حالت بیشتر و قدرت هضم و تجزیه پذیری دام ها در این حالت بـالاتر خواهـد بود. البته لازم به ذکر است که در حیواناتی با معـده هـای چنـد قسـمتی و تخصـص یافتـه تفـاوت هـایی مشخصی براساس نوع و تعداد معده کاذب، ساختار دیواره های دستگاه گوارش براساس نـوع عضـلات صاف و حلقوی، ظرفیت دستگاه و نوع انقباضات دیده می شود. این تفاوت ها گـاهی آنقـدر زیـاد مـی گردند که سبب تغییر در نوع عادت غذایی حیوان مانند خشبی خواری و یا سرشاخه خواری مـی گـردد. اما حیواناتی که تخمیر در بخش انتهایی دستگاه گوارش آنها دیـده مـی شـود، انـدام تخصـص یافتـه در بخش پیشین دستگاه گوارش آنها کمتر دیده مـی شـود. در ایـن حیوانـات معـده کـاذب وجـود نداشـته (دارای معده واقعی یا یک قسمتی هستند) و قدرت بازگشت غذا از معـده بـه دهـان را نخواهنـد داشـت. ولی باید در نظر داشت که این دسته از حیوانات دارای اندام تخصص یافته تر به نام روده بزرگ و سکوم در بخش انتهایی خود شده اند که می توانند مواد غذایی بجا مانـده از مسـیر هضـم و جـذب را در آنجـا تخمیـر و اقـلام مـورد نیـاز خـود را از طریـق جـذب محـدود از دیـواره روده بـزرگ و سـکوم و یـا بـا بازگرداندن آن به بخش انتهایی روده کوچک انجام دهند. این اندام می توانند در اسب بسیار گسـترده و در خوک همراه با ترشحات دیده شوند. از بخش های مهم این دستگاه قدرت انقباض در دیواره مذکور

است که به صورت امواج ضد دودی می توانند غذا را به انتهای روده کوچک بازگردانند. اما در صورت نارسا بودن این رویه و فقدان جذب کافی مواد غذایی و ویتامین ها حیوان مبادرت به خوردن مدفوع خود نموده تا بتواند روش هضم، تخمیر و جذب را کامل نماید. این حالت سبب بروز پیچیده ترین رفتار تغذیه ایی در حیوانات به خصوص خوک ها شده است که می تواند دوره بیماری های انگلی را کامل نمایند. البته باید توجه نمود کیفیت مواد غذایی مصرف شده می تواند در بروز رفتارهای ثانویه دام تاثیر و حیوان را از خوردن مدفوع متوقف نماید. با این حال می توان براساس شناخت از وضعیت ظاهری دستگاه گوارش و جایگاه اندام آن به نوع تفاوت های کارآیی دستگاه گوارشی بیشتر پی برد. به طور مثال؛ می توان بیشتر بودن ترشحات دوازده در حیوانات نشخوارکننده را در مقابل سایر علفخوارها توجیه نمود. بدین صورت که تخمیر در ناحیه پیشین دستگاه گوارش آنها بروز کیموس اسیدی را افزایش و جهت خنثی سازی آن به ترشحات دوازده احتیاج بیشتری خواهد بود. و همچنین علت قدرت آبگیری و جذب بیشتر حیواناتی با سکوم و روده بزرگ تخصص یافته تر میزان دفع مایعات بدنی و املاح مورد نیاز کمتر خواهد بود.

۴-۱ نشخوارکنندگان و توسعه معده چند قسمتی

همانطور که در مباحث پیشین اشاره شد نشخوارکنندگان را در راسته زوج سمان که دارای شش خانواده هستند، تقسیم بندی می نمایند. نشخوارکنندگان دارای یک معده چهارقسمتی (نگاری، شکمبه، هزارلا، شیردان) می باشند، که در خانواده آهوسانان بخش هزارلای آنها تحلیل رفته است. روند تکاملی این دسته از موجودات، طبق آزمایشات انجام شده بر فسیل های باقی مانده، ۵۰ میلیون سال برآورده شده است (شکل ۵-۱). کارشناسان معتقدند در طی این مدت و به دلیل بروز شرایط آب و هوایی متفاوت، تغییرات شگرفی در تعداد گونه ها، اندازه و تیپ ظاهری نشخوارکنندگان بوجود آمده است.



شکل ۵-۱ روند تکاملی و خانواده های به جا مانده از نشخوارکنندگان واقعی (واحد میلیون سال).

با تمام تغییرات مداوم ایجاد شده در تعداد گونه ها امروزه در حدود ۲۰۰ گونه وحشی از نشخوارکنندگان در محیط آزاد شناسایی شده اند که بیشتر از خانواده گاوسانان و گوزن سانان می باشند. برای شناسایی بهتر نشخوارکنندگان واقعی لازم است چگونگی پراکنش آنها مورد مطالعه قرار بگیرند.

در این راستا کارشناسان پراکنش دام ها را براساس شرایط آب و هوایی، زیستگاه اصلی جانور و انشقاق قاره ها بیان نموده اند که در جدول ۲-۱ آورده شده است. اما چگونگی پراکنش دام های اهلی که در ردیف نشخوارکنندگان قرار دارد، در جدول ۳-۱ اشاره شده است. تعریف دام اهلی اگر چه می تواند از یک اقلیم به اقلیم بعدی متفاوت باشد، اما به طور معمول نه گونه از ۱۲ گونه اصلی تقسیم شده را در بر می گیرد. در این کتاب بررسی های انجام شده جهت تغییرات گونه های میکروبی شکمبه در اطراف این ۹ گونه دامی خواهد بود.

جدول ۲-۱ درصد پراکنش نشخوارکنندگان واقعی و اثر زیستگاه، آب و هوا و قاره ها بر روی آنها.

خانواده	زیستگاه			آب و هوا			قاره ها		
	استپ	بیشه زار	جنگل	سرد	معتدل	گرم	آمریکا	آفریقا	اوراسیا
Trgulidae	۰	۰	۱۰۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۲۵	۷۵
Cervidae	۲۰	۳۰	۵۰	۶/۷	۴۶/۷	۴۶/۷	۴۳/۳	۰	۶۳/۳
Bovidae	۴۲/۲	۳۲/۴	۲۵/۴	۸/۸	۱۶/۷	۷۴/۵	۴/۹	۶۷/۶	۲۸/۴
Giraffidae	۰	۵۰	۵۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰
Antilocapridae	۱۰۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۰
Muschidae	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰
کل پراکنش	۳۵/۵	۳۱/۹	۳۲/۶	۹/۲	۲۲	۶۸/۸	۱۳/۵	۵۱/۱	۳۷/۶

اما چرا بین همه نشخوارکنندگان شناخته شده این نه گونه مورد توجه انسان قرار گرفته است؟ کارشناسان علت را عادت پذیری بالای این گونه ها، تابعیت بهتر، کنترل ساده، تولیدات گسترده تر، اندازه جثه مناسب، طیف بالای خوراک مصرفی و اندام مناسب آنها جهت مهاجرت های طولانی می دانند. مهمترین خصوصیات این دسته از گونه های نشخوارکننده مصرف علوفه خشبی در حد بالا و خصوصیات چراگری آنها می باشد.

۱-۴-۱ توسعه شکمبه در دوران شیر خوارگی

دستگاه گوارشی نشخوارکنندگان در زمان شیرخوارگی نسبت به سایر دوران ها متفاوت تر دیده می شود. این اختلاف به دو شکل وضعیت ظاهری و عملکردی نمایان می گردد که در بین تمامی موجودات بی نظیر و یک تکامل سریع الوصف می باشد. این تفاوت ناشی از فقدان شکمبه، نگاری و

هزارلای (معده تخمیری) توسعه یافته و عدم نقش آنها در دستگاه گوارشی است. در صورتیکه شیردان یا معده واقعی که ۸۰ درصد وزن و حجم دستگاه معده ای را در زمان شیرخوارگی و تولد تشکیل می دهد، دارای ترشحات گوارشی می باشد.

جدول ۳-۱ مهمترین نشخوارکنندگان اهلی و جزئیات اهلی شدن آنها.

گونه ها	اجداد اولیه	اهلی شدن: تاریخ	اهلی شدن: خاستگاه	اهلی شدن: دلایل
بزها (Capra hircus)	Benzoar goat (*C. aegagrus*), Markhor (*C. falconeri*)	۱۰۰۰۰ سال پیش	آسیا و خاورمیانه	گوشت
گوسفندها (Ovis aries)	Mouflon (*O. musimon*), Marco Polo (*O. ammon*), Urial (*O. vignei*)	۷۰۰۰ سال پیش	آسیا و خاورمیانه	گوشت
گاوهای اروپایی (Bos taurus)	European auroch (*B.primigenius primigenius*)	۶۲۰۰ سال پیش	آسیا و خاورمیانه	قربانی و معامله
گاوهای زبو (Bos indicus)	Indian auroch (*B. p. namadicus*)	۲۵۰۰ سال پیش	جنوب غرب آسیا و هند	قربانی، معامله و تولید شیر
بوفالوها (Bubalus bubalis)	Water buffalo (*B. b. bubalis, B. b. carabanesis*)	۲۵۰۰ سال پیش	چین و هندوچین	قربانی و شیر
میتان ها (Bos frontalis)	Gaur (*B. gaurus*)	۲۵۰۰ سال پیش	هند و آسیای جنوب شرق	قربانی و معامله
رینديرها (Rangifer tarandus)	Caribou (*R. tarandus*)	نامشخص	شمال اروپا و آسیا	گوشت، حمل کالا و تولید شیر
یاک ها (Bos mutus)	Wild yak (*B. grunniens*)	نامشخص	هیمالیا و سیبری	گوشت، شیر و حمل کالا
بالی گاوها (Bos javanicus)	Banteng (*B. javanicus*)	نامشخص	جنوب آسیا و بورنو	گوشت و معامله

در این حالت می توان نقش دستگاه گوارش دام تازه متولد شده را با وجود معده تخمیری توسعه نیافته و کوچک، تک معده ای قلمداد نمود. به دلیل عدم فعالیت شکمبه و سایر قسمت های معده تخمیری و وجود هضم آنزیمی مواد غذایی، استفاده از خوراک خشبی و سایر خوراک های گیاهی مشابه نامناسب و محدود کننده شناخته می شود. از طرف دیگر به دلیل عدم فعالیت معده تخمیری ورود هر گونه ماده خوراکی حتی شیر هم نامطلوب تلقی شده و عامل اصلی اسهال در دوران شیرخوارگی

محسوب می گردد. بدین منظور به طور طبیعی دستگاه شیار مری، خوراک مصرفی به خصوص شیر را مستقیما به شیردان که بزرگتر از معده تخمیری بوده وارد می کند.

صرفه نظر از زمان شیرگیری و چگونگی آن، می توان عنوان کرد که توسعه دستگاه گوارش به خصوص معده تخمیری به نوع خوراک مصرفی وابسته است. اولین گام از توسعه معده تخمیری، توسعه دیواره شکمبه می باشد که در اثر زیادتر شدن و رشد سلول های فلس مانند آن (در طول سه هفته) زائده هایی پرز شکلی به نام پاپیلا را ایجاد می نماید. این توسعه در زمان تکامل پیش نشخواری (مصرف خوراک جایگزین شیر مانند دانه خواری) به نشخواری جهت جذب بیشتر مواد غذایی به خصوص اسیدهای چرب فرار شدت بیشتری خواهد داشت. توسعه و رشد پاپیلاها که یک تکامل سریع از دوران پیش نشخواری به نشخواری در نظر گرفته می شود، در شکمبه بیشتر تابع اسیدهای چرب فرار می باشد. همه اسیدهای چرب فرار به یک اندازه در رشد و نقش پاپیلاها موثر نیستند. مهمترین عامل تحریک و رشد پاپیلاها مربوط به اسید بوتیریک تولید شده و سپس اسید پروپیونیک می باشد. تراکم پاپیلاها تعیین کننده میزان جذب مواد غذایی تخمیر شده بخصوص اسیدهای چرب فرار می باشد. این میزان به نوع خوراک و سن حیوان وابسته می باشد. تراکم پاپیلا عبارتنداز تعداد مشخصی از پاپیلاها در هر سانتیمتر مربع را گویند.

دومین گام از توسعه معده تخمیری، تاثیر نوع ماده خوراکی بر رشد و توسعه شکمبه می باشد. خوراک مایع مانند شیر یا جایگزین های آن کمترین میزان رشد و توسعه را در معده تخمیری ایجاد می نمایند. اما با این ترتیب باز میزان رشد شکمبه از رشد شیردان سریعتر و در مدت زمان اندکی (براساس نوع تولیدات نهایی دام مدت زمان آن متغیر و تقریبا ۶ هفته عنوان می دارند) حجم و اندازه طولی هر دو برابر خواهد شد. افزایش ماده خشک جیره و استفاده از خوراک خشبی سرعت توسعه و رشد معده تخمیری را افزایش داده و ظرف مدت زمان اندکی تمامی محوطه شکمی را خواهد گرفت. ترکیب شیمیایی خوراک و اثر آن بر ترکیب شیمیایی کیموس معده تخمیری هم اثر فراوانی در رشد پاپیلاها و معده تخمیری خواهد داشت. جیره های حاوی کازئین، نشاسته و سلولز سریع الهضم به دلیل تولید اسیدهای چرب فرار بیشترین اثر را در توسعه معده تخمیری ایجاد خواهند کرد. علاوه بر اسیدهای چرب فرار، اسیدیته شکمبه (اسیدیته مزبور بین ۵/۶ تا ۶/۵ می باشد) بطور غیر مستقیم بر توسعه معده تخمیری تاثیر بسزایی خواهد داشت. این تاثیر براساس دامنه فعالیت میکروارگانیسم ها در اسیدیته های مختلف و تولیدات آنها (اسیدهای چرب فرار) می باشد. اما، سومین گام توسعه معده تخمیری شامل فعالیت های مناسب و بدون وقفه میکروارگانیسم ها می باشد. در سنین اولیه دام و دوران شیرخوارگی معده نشخوارکنندگان عاری از میکروارگانیسم های فعال بوده و گاه در حد استریل می باشد. اما با ورود ماده

خشک مصرفی میکروارگانیسم های هوازی اولین تک یاخته های معده تخمیری در حال توسعه خواهند بود. سپس ورود سایر میکروارگانیسم ها براساس مقاومت به اسیدیته آغاز می شود، که عدم حضور یک گروه از آنها به دلایل مختلف می تواند بلوغ فعالیتی شکمبه را به تاخیر انداخته و دام را از طیف گسترده خوراک محدود نماید. اگر چه حضور و توسعه میکروارگانیسم های شکمبه به طور طبیعی بوسیله مصرف خوراک صورت می گیرد، اما براساس نوع جیره غذایی می توان غالبیت هر یک را بر دیگری افزایش داد. در نهایت جهت توسعه فعالیت های تخمیری در شکمبه لازم است که همواره مقدار تولید و فرآورده های نهایی از دستگاه گوارش کنترل گردد. پس از توسعه و رشد کامل معده تخمیری، شکمبه ۸۰ درصد دستگاه گوارشی معده ای را تشکیل خواهد داد.

۲-۴-۱ توسعه شکمبه در دوران رشد و تولید

رشد و توسعه شکمبه تنها در دوران شیرخوارگی اتفاق نمی افتد. این رشد یا توسعه شکمبه در دام های بالغ اگر چه مشابه دوران شیرخوارگی نیست، اما مشاهده می شود. از آنجا که توسعه شکمبه و تغییرات ناشی از آن می تواند تا حدودی به شکل ظاهری و حالت عملکردی شکمبه مرتبط باشد، لذا با تغییر فصل، شرایط فیزیولوژیک دام و نوع گونه گیاهی تغییر می کند. آن هنگام که خوراک از لحاظ کمیت به صورت محدود و در فصل زمستان با کیفیت نامطلوب تری به مصرف دام می رسد، تراکم پاپیلاها کمتر شده و حجم شکمبه کاهش می یابد. این کاهش در حجم شکمبه فعالیت میکروارگانیسم ها را تحت تاثیر قرار داده و با این تغییر فعالیت های فیزیکی شکمبه که خود تابع فرآورده های پایانی تخمیر است، تغییر می یابد. از طرف دیگر، در فصل بهار و تابستان حجم شکمبه جهت مصرف خوراک بیشتر و بدست آوردن انرژی از دست رفته توسعه می یابد. کیفیت مطلوب خوراک و مصرف مواد متراکم در فصول بهار و تابستان میزان تراکم پاپیلاها را افزایش داده و نحوه فعالیت میکروارگانیسم ها را تغییر می دهد. توسعه شکمبه تنها به شرایط اقلیمی و گیاهی وابسته نبوده و با تغییرات آناتومی بدن مانند آبستنی تغییر می یابد. بدین صورت که با افزایش حجم آبستنی، میزان حجم شکمبه به دلیل اشغال محوطه شکمی توسط جنین، کمتر شده و لذا عملکرد و حجم شکمبه با افزایش سرعت عبور مواد مغذی و تغییر گونه میکروبی از جمعیت سلولایتیک غالب به آمیلولایتیک تغییر می یابد.

۳-۴-۱ مزیت معده چند قسمتی یا تخمیری

همواره تامین مواد غذایی مشکل ترین مسئله موجود در بین جانداران بوده است. در فصول سرد سال به دلیل کاهش کمیت و کیفیت خوراک مصرفی ناشی از کاهش گونه های گیاهی مهاجرت های اجباری جانوری به شکل گسترده اتفاق می افتد. این عارضه در بخش پرورشی با تامین سخت خوراک

آشکار می شود. در حالیکه، دستگاه گوارش حیواناتی با معده تخمیری این مشکل را کمتر خواهند داشت. به طور مثال؛ پروتئین یکی از مواد غذایی گران قیمت است که باید در دسترس جانداران قرار گیرد. اما نشخوارکنندگان با داشتن عملکرد مناسب در شکمبه می توانند آن را از ارزان ترین خوراک ها مانند مراتع، علوفه های خشبی و کودهای شیمیایی اوره دار تامین نموده و کمترین اتلاف را در از دست دادن ازت بدن (توسط چرخه ازت در بزاق، شکمبه و خون) داشته باشند. علت اصلی قدرت تامین مواد غذایی به صورت ارزان قیمت در حیواناتی با معده تخمیری وجود میکروارگانیسم ها در شکمبه است که در رفع احتیاجات کوشا و بالطبع احتیاجات دام را مرتفع می نمایند. انرژی مثال دیگری از اقلام مورد نیاز بدن است که دام هایی با معده تخمیری می توانند آن را از ارزان ترین و گسترده ترین خوراک مانند علوفه های خشبی که در طول زمستان و تابستان به وفور یافت می شوند، بدست آورند. دام ها می توانند با مصرف علوفه خشبی یا هر ماده دیگری اقدام به تجزیه و هضم مناسب سلولز و تا حدودی لیگنین نموده و انرژی مورد نیاز خود را از این تخمیر میکروبی بدست آورند.

در واقع نمی توان گفت که وضعیت دستگاه گوارش در حالت معده تخمیری بهتر از تک معده ای ها می باشد. اما به دلیل رجحان این معده در هضم خوراک های نامتعارف و غیر قابل مصرف توسط بخش عظیمی از موجودات، کارشناسان را بر این باور رسانده است که دارای مزیت بالاتری در میان سایر موجودات علف خوار خواهند بود. همین مزیت سبب پراکنش مناسب تر این حیوانات در دنیا شده است. از مزایای دیگر معده تخمیری تامین تعدادی از ویتامین ها مانند B_{12} می باشد که توسط میکروارگانیسم ها تولید و یا آزاد می گردد. به همین دلیل میزان تقاضای ویتامین در نشخوارکنندگان در حداقل سایر موجودات قرار دارد. از مزیت های بسیار مهم دیگر معده تخمیری تغییر پراکنش میکروبی آن و بالطبع تغییر نوع عادت غذایی دام می باشد. در دستگاه تک معده ای به دلیل هضم آنزیمی، تغییر عادات غذایی سخت و گاه غیرممکن می باشد. اما در نشخوارکنندگان این مسئله با تغییر نوع و فعالیت میکروارگانیسم ها تا حدی قابل کنترل خواهد بود.

اساسی ترین مزیت های عملکردی معده تخمیری در حیوانات نشخوارکننده مشخص است. اما وجود این معده در دستگاه گوارش تفاوت های را در بین علف خواران بوجود آورده است که قابل چشم پوشی نمی باشد. به طور مثال؛ وجود روند بازگشت غذا از نگاری- شکمبه به دهان جهت خردن شدن خوراک و مخلوط بهتر بزاق و شیره های گوارشی با غذای مصرف شده است. این عامل در اندک گیاهخواران دیده می شود که مدیون حضور معده تخمیری در آنها می باشد. همچنین مهمترین تفاوت دیگر ماده اولیه تامین انرژی در حیوانات است که در نشخوارکنندگان شامل اسیدهای چرب فرار به خصوص اسیدهای استیک، پروپیونیک و بوتیریک تولید شده از تخمیر شکمبه ای می باشد. در صورتی

که ماده اولیه انرژی در بدن موجودات به طور غالب قندها به خصوص گلوکز می باشد. یا از تفاوت های دیگر، گردش و بازیافت ازت خون در شکمبه و ساخت پروتئین از آن در زمان های کمبود مواد پروتئینی است که در سایر موجودات بدین صورت دیده نمی شود.

۵–۱ جهت مطالعه بیشتر

- Afzalzadeh, A., B. D. Hovell. (2002). Comparison of omasal and bomasal stimulation by VFA and hypertonic solution. Proceeding of the British Society of Animal Science. U.K. Scareborough.
- Afzalzadeh, A., B. D. Hovell, Kyle. (1998). Role of omasum in the control of feed intake and rumen digesta outflow. J. Agricultural Sicence and Technology. Iran. April 4. pp: 37-50.
- Afzalzadeh, A., M. Absalan, A. A. Khadem, S. D. Sharifi, M. Pourabedin. (2010). Effects of whole cottonseed on small intestine morphology of chaal fattening male lambs. 17^{th} international krmiva. P:101.
- Allard, M. W., M. M. Miyamoto, L. Jarecki, F. Kraus, M. R. Tennant (1992). DNA systematic and evolution of the artiodactyls family Bovidae. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 89:3972-3976.
- Church, D. C. (1988). The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Collinson, M. E., J. J. Hooker. (1991). Fossil evidence of interactions between plants and plant eating mamalia. Phil Tranc R Soc Lond B 333: 197.
- Davis, C. L., J. K. Drackley. (1998). The development, nutrition, and management of the young calf. Iowa State University Press. Ames, IA.
- DeMiguel, D., M. Fortelius, B. Azanza, J. Morales. (2008). Ancestral feeding state of ruminants reconsidered: earliest grazing adaptation claims a mixed condition for Cervidae. BMC Evolutionary Biology 8:13.
- FAO. (2008). Domestic animal diversity information system. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, IT. http://lprdad.fao.org
- Feldhamer, G. A., L. C. Drickamer, S. H. Vessey, J. F. Merrit, C. Krajewski. (2007). Mammalogy: adaptation, diversity, and ecology. 3rd Ed. The John Hopkins Univ. Press, Baltimore, MD.

- Fernandez, M. H., E. S. Vrba. (2005). A complete estimate of the phylogenetic relationships in ruminantia: a dated species-level super tree of the extant ruminants. Biological Reviews 80(2):269-302.
- Gentry, A. W. (2000). The ruminant radiation. Pages: 11-25 in Antelopes, deer, and relatives: Fossil record, Behavioral ecology, systematics, and conservation. E. Vbra and G. B. Schaller. Yale Univ. Press, New Haven, CT.
- Hackmann, T. (2008). A Thesis: Studies of ruminant digestion, ecology and evolution. University of Missouri-Columbia
- Hofmann, R. R. (1985). Biology of deer production. N. Z. Bull. 22.
- Honacki, J. H., K. E. Kinman and J. W. Koeppl. (1982). Mammal species of the world. Allen Press, Inc and the Assoc of Systematics Collections, Lawrence, KS, USA.
- Janis, C. M. (1993). Tertiary mammal evolution in the context of changing climates, vegetation, and tectonic events. Annu. Rev. Ecol. Syst. 24:467-500.
- McKenna, M. C., S. K. Bell. (1997). Classification of mammals above the species level. Columbia University Press, New York.
- Metais, G., I. Vislobokova. (2007). Basal ruminants. Pages 189 – 212 in The evolution of the artiodactyls. D. R. Prothero and S. E. Foss, Ed. The John Hopkins Univ. Press, Baltimore MD.
- Nickel, R., A. Schummer and E. Seiferle. (1973). The Viscera of the domestic mammals. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Nowak, R. M. (1999). Walker's mammals of the world. Vol 2. 6th ed. John Hopkins Univ. Press: Baltimore, MD.
- Van Soest, P. J. (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Webb, S. D. (1998). Hornless ruminants. Pages 463- 76 in Evolution of Tertiary Mammals of North America: Volume 1, Terrestrial Carnivores, ungulates, and ungulate like mammals. C. M. Janis, K. M. Scott, L. L. Jacobs, ed. Cambridge Univ. Press: Cambridge, UK.
- Zeder, M. A., B. Hesse. (2000). The initial domestication of goats (Capra hircus) in the Zagros Mountains 10,000 years ago. Science. 287:2254-2257.

فصل دوم

هضم، جذب و متابولیسم

۱-۲ دستگاه گوارش در نشخوارکنندگان	۴۲
۲-۲ هضم مواد غذایی در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان	۴۵
۳-۲ جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان	۵۰
۴-۲ متابولیسم در شکمبه	۵۵
۵-۲ کنترل متابولیسم	۸۵
۶-۲ برای مطالعه بیشتر	۸۶

هضم، جذب و متابولیسم

روش هضم و جذب نشخوارکنندگان به دلیل فعالیت میکروارگانیسم ها نسبت به غیرنشخوارکنندگان پیچیده تر و کاملا متفاوت می باشد. هضم و جذب در تک معده ای ها براساس حضور آنزیم ها و تجزیه نسبی مواد غذایی در معده و حداکثر جذب در سایر قسمت های دستگاه گوارش اتفاق می افتد. اما در نشخوارکنندگان به دلیل فرآیند پیچیده تخمیر توسط میکروارگانیسم ها و هضم و جذب مواد غذایی توسط آنها، پروسه هضم و جذب در دام ها بسیار متفاوت می باشد. این تفاوت سبب می شود که نشخوارکنندگان برای استفاده از کربوهیدرات، چربی و پروتئین از مسیر پیچیده تری استفاده کنند. به طور مثال؛ کربوهیدرات مسیر تولید اسیدهای چرب فرار، متان و دی اکسید کربن را طی نموده و در این راستا اسیدهای چرب فرار به عنوان یک ماده سوختنی به جای گلوکز در نشخوارکننده کاربرد دارد.

هضم اگر چه می تواند تعاریف مختلفی داشته باشد ولی به مجموعه ای از پروسه های گفته می شود که مواد غذایی به اجزای سازنده آن تبدیل و آنرا آماده جذب می نماید. هضم در نشخوارکنندگان بیشتر (قریب ۹۰ درصد) توسط تخمیر میکروبی تحت اثر هیدرولیز و آنزیم های آنها در شکمبه و نگاری صورت می گیرد. از طرف دیگر علاوه بر جذب روده ای در نشخوارکنندگان بعضی از مواد حاصل از تخمیر بخصوص اسیدهای چرب فرار و آمونیاک اضافی جذب دیواره شکمبه می شوند. این روند سبب پویایی معده تخمیری و ادامه هضم در آن می شود. نهایتا طبق نظرات محققین جذب شامل یکدسته از پروسه هایی است که سبب انتقال اجزای شیمیایی غذای هضم شده در معده و روده به رگ های خونی می شود.

۲-۱ دستگاه گوارش در نشخوارکنندگان

جویدن خوراک در دهان اولین پروسه دستگاه گوارش برای نشخوارکنندگان می باشد که اهمیت بسیار بالایی دارد. این عملیات آنقدر در تخمیر مواد غذایی اهمیت دارد که نشخوارکنندگان بخصوص گاوها، روزانه بین ۴۰ تا ۵۰ هزار عملیات جویدن را تحت عناوین مختلف مانند نشخوار و غیره انجام می دهند. این مکانیسم همراه با ترشح بزاق سبب پایداری عملیات هضم و جذب خوراک در شکمبه و سایر قسمت های دستگاه گوارش می شود. سپس خوراک از راه مری وارد بخش بعدی دستگاه گوارش می گردد که کیسه ایی به ظرفیت ۱۸۰ تا ۲۲۷ لیتر در گاو و ۱۴ تا ۲۵ لیتر در گوسفند می باشد. این کیسه خود به دو بخش نگاری (کیسه جلویی و کوچکتر) و شکمبه (کیسه عقبی و بزرگتر) تقسیم می گردد. در این بخش تقریبا ۵۰۰ هزار بیلیون باکتری، ۵۰ بیلیون پروتوزئوآ و مقادیر زیادی قارچ به صورت

همزیست زندگی می کنند. نگاری جهت عملیات نشخوار و بازگشت خوراک کاربرد بیشتری داشته و شکمبه با زائده های انگشت مانند خود بیشتر جهت پایدار کردن تخمیر میکروبی مبادرت به جذب مواد تولید شده ناشی از فعالیت میکروب ها مانند اسیدهای چرب فرار و آمونیاک می پردازد.

بعد از فرآیند تخمیر، مواد غذایی تولیدی و یا فرآوری شده وارد قسمت هزارلا می گردد. این بخش قابلیت جداسازی خوراک مصرف شده را براساس اندازه طولی دارا می باشد. مواد وارد شده در آن به صورت مناسب آبگیری و به قسمت بعدی انتقال می یابد. همچنین این بخش فاقد قدرت تخمیری بوده و دارای ساختمان تیغه ای برگ مانندی است که تقریبا ۱۰۰ تیغه را جهت آبگیری بهتر شامل می شود. این بخش می تواند اسیدهای چرب فرار جذب نشده، سدیم و پتاسیم را به نحو مطلوبی جذب نماید. بعد از آبگیری، مواد تخمیر شده وارد فاز تجزیه آنزیمی در بخش شیردان یا معده واقعی ترشحی می شوند. شیردان چهارمین کیسه گوارشی در نشخوارکنندگان محسوب می گردد. دیواره شیردان دارای قدرت ترشح آنزیمی و اسیدکلریدریک بوده و اسیدیته آن تا ۲/۵ می رسد. محل تجزیه پروتئین های میکروبی در این بخش انجام گرفته و سایر پروتئین های عبوری نیز در این محل شکسته می شوند. بعد از شیردان روده کوچک به ابعاد ۳۵ تا ۴۰ متر طول و ۳ تا ۴ سانتی متر قطر می باشد که براساس نوع وظیفه به سه بخش دوازده، ژئوژنوم و ایلئوم تقسیم می گردد. غدد ترشحی (کبد و پانکراس) و بخش های آنزیمی روده مواد ترشحی خود را وارد روده کوچک کرده و ترشحات انجام شده همراه با سایر ترشحات دیگر در روده اقدام به هضم و خرد کردن مواد غذایی می کنند. اسیدیته مورد نیاز این بخش بین ۶ تا ۸ متغیر و جهت انجام فعالیت آنزیمی اهمیت دارد. مهمترین فعالیت آنزیمی روده کوچک خرد کردن پروتئین به اسیدهای آمینه، نشاسته به گلوکز و چربی به سازنده های آن یعنی اسیدهای چرب می باشد. سیستم جذب در روده کوچک بیشتر در نیمه دوم روده قرار دارد. بعد از روده کوچک، کیموس گوارشی وارد روده بزرگ شده که آخرین مراحل گوارشی در آن شکل می گیرد. این بخش به سکوم، کلون و رکتوم تقسیم بندی می گردد. براساس نوع دام فعالیت گوارشی در این بخش متفاوت می باشد، اما در همه آنها جذب آب به صورت برجسته مورد توجه قرار گرفته است و جذب املاح هم همراه با جذب آب به طور کامل صورت می گیرد. فعالیت میکروبی در این بخش از دستگاه گوارش فعال و ۱۵ درصد از کل فعالیت تخمیری سیستم گوارش را شامل می شود.

۱-۱-۲ خصوصیات شکمبه

بررسی فعالیت ها و خصوصیات دستگاه گوارش، به خصوص شکمبه و نگاری، از دغدغه های اصلی کارشناسان ذی ربط می باشد. بدین جهت بررسی های گسترده ای بر روی خصوصیات شکمبه و

فعالیت های آن صورت گرفته است. شکمبه و نگاری محیط مناسبی را برای فعالیت و رشد میکروارگانیسم ها ایجاد می نمایند. اما این محیط به دلیل شرایط بیرونی دائما دستخوش تغییراتی بوده که براساس روش های مختلفی تنظیم و به شکل اولیه باز می گردد. خصوصیات مورد اشاره در شکمبه و نگاری عبارتنداز:

۱. تغییرات فشار اسمزی؛ در حالت عادی همواره بین ۲۵۰ تا ۳۴۰ میلی اسمز در هر لیتر از مایع شکمبه می باشد. اما گاهی به دلیل مصرف زیاد مواد متراکم میزان آن به ۴۰۰ میلی اسمز در هر لیتر مایع شکمبه می رسد که توسط تشکیلات بافری بزاق، مصرف آب، تراوش و یا جذب توسط دیواره شکمبه تغییرات ایجاد شده کنترل می گردد.
۲. اسیدیته محیط شکمبه؛ یکی دیگر از حالت های درونی شکمبه می باشد که همواره بین ۵/۵ تا ۷/۲ قابل نوسان است. افزایش بیش از اندازه اسیدیته سبب کاهش و یا توقف تخمیر و گاه مرگ دام می شود. مصرف بیش از اندازه مواد متراکم و یا کاهش مصرف علوفه سبب اسیدی شدن محیط شکمبه و نگاری می گردد.
۳. ظرفیت شکمبه؛ در مقایسه با غیرنشخوارکنندگان ظرفیت نهایی دستگاه گوارش نشخوارکنندگان بسیار بالاست. این ظرفیت به دلیل نوع خوراک مصرفی یکی از نیازهای اساسی دام محسوب می شود. ظرفیت شکمبه براساس نوع خوراک مصرفی، شرایط فصلی، سن و جنس دام متغیر می باشد. تقریبا ۱۶ درصد وزن بدن را دستگاه گوارش تشکیل می دهد. ظرفیت شکمبه می تواند به طور مستقیم بر مصرف خوراک و نرخ عبور آن اثر بسزایی داشته باشد.
۴. نرخ عبور؛ همواره جریان یا خروج مواد مغذی به صورت جامد یا مایع از شکمبه مدنظر محققین علم تغذیه بوده است. کارشناسان عبور مواد غذایی هضم شده معلق در مایع شکمبه را ترقیق می نامند. ترقیق بخشی از مایع هضمی شکمبه است که در واحد زمان شکمبه را ترک می نماید. نرخ عبور چه بصورت ترقیق و یا جامد تابع بسیاری از عوامل محیطی (فصل، حرارت و طول روز)، دامی (اندازه و جنس دام، نژاد و حالت های فیزیولوژیکی دام مانند آبستنی) و خوراکی یا جیره (کمیت و کیفیت خوراک مصرفی، اندازه ذرات، فرآورده های نهایی تخمیر، رفتار و اثرات متقابل خوراک ها و ماهیت فیزیکوشیمیایی آنها) قرار دارد که بصورت مستقیم و یا غیر مستقیم وارد عمل می شوند. نرخ عبور می تواند به نحو مطلوب بیان کننده حالات شکمبه و نگاری باشد.
۵. نرخ تجزیه پذیری خوراک؛ عبارت است از ناپدید شدن یک یا چند ماده غذایی بر اثر فعالیت های میکروارگانیسمی که براساس اختلاف میزان مواد وارد شده به خارج شده بنیان نهاده شده است. این نرخ تابع دو فاکتور اساسی ماهیت فیزیکی-شیمیایی ماده خوراکی (درصد حضور

لیگنین، نشاسته، فیبر، مواد ضد تغذیه ایی، نوع پلیمرهای سلولزی، میزان حضور چربی و پروتئین، وزن مخصوص، قابلیت خرد شدن و کوچک شدن، قدرت نگهداری آب و ظرفیت تبادل کاتیونی) و محیط شکمبه (اسیدیته، فلور میکروبی، فشار اسمزی، ویسکوزیته، غلظت اسیدهای چرب فرار و آمونیاک) که خود متاثر از اولی و سطح مصرف می باشد، قرار دارد.

۶. فاز تاخیری؛ مدت زمان لازم برای اولین تجزیه ماده مغذی، یعنی از زمانی که مواد در داخل شکمبه قرار می گیرند تا زمانی که شروع به تجزیه پذیری کنند، را زمان تاخیری گویند. این خصوصیت تابع ماهیت فیزیکی-شیمیایی خوراک و محیط شکمبه می باشد. پس از آبگیری، تبادل کاتیونی مواد مغذی آغاز می شود تا تجزیه مواد مغذی شکل گیرد. فاصله آبگیری تا تجزیه مواد مغذی توسط آنزیم را فاز تاخیر می گویند. اهمیت این فاز زمانی آشکار می شود که نرخ عبور مواد جامد سریع و میانگین توقف آنها در شکمبه کم است. لذا فاز تاخیر مدتی از زمان تجزیه پذیری مواد جامد را اشغال و سبب کاهش میزان تجزیه پذیری کامل آنها می شود.

با توجه به شناسایی خصوصیات شکمبه و کنترل آنها می توان تغییرات مطلوب و مورد نظر را اعمال نمود. عدم اطلاعات دقیق از فاکتورهای اشاره شده سبب از دست رفتن بانک ژنتیکی موجود در شکمبه، کاهش قدرت هضم و تخمیر شکمبه ای و حذف میکروب های تلقیح شده می گردد.

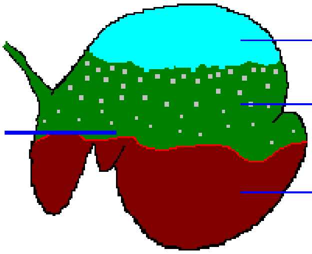
۲-۲ هضم مواد غذایی در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان

هضم در نشخوارکنندگان به دو صورت میکروبی و ترشحی در دستگاه گوارش انجام می گیرد. هضم میکروبی بیشتر در شکمبه، نگاری و بسیار اندک در سکوم و روده بزرگ انجام می شود. هضم ترشحی در تمامی قسمت های دستگاه گوارش بجز شکمبه، نگاری و هزارلا صورت می پذیرد. نرخ هضم که عبارتنداز قابلیت هضم پذیری مواد مغذی در واحد زمان، در بخش های مختلف دستگاه گوارش به دلیل تنوع آنزیم های هضمی-گوارشی و نوع هضم ترشحی یا میکروبی و گاه مشارکتی متفاوت می باشد.

۲-۲-۱ هضم میکروبی

تقریبا ۸۵-۷۰ درصد مواد قابل هضم جیره در داخل نگاری- شکمبه هضم و تجزیه می شوند. اما این میزان از هضم به شدت وابسته به اندازه ذرات، کمیت و کیفیت خوراک مصرفی، قدرت چسبندگی میکروب ها (یا آنزیم های گوارشی) به مواد مغذی، اثرات محیطی (مانند حرارت)، عوامل حیوانی، تولیدات ناشی از هضم، قابلیت هضم مواد مغذی و اثرات آنها بر همدیگر و تنوع میکروبی می باشد.

اندازه ذرات به دو صورت هضم را دچار تغییر می کند. گاه سبب از دست رفتن بخشی از ماده خوراکی به دلیل عدم دسترسی میکروب ها و آنزیم های ترشحی حیوان به مواد مغذی می شود، که باید بوسیله عملیات فرآوری فیزیکی مانند خرد کردن و یا ترغیب دام به نشخوار این معضل را رفع و نرخ هضم را افزایش داد. و یا به دلیل پایین بودن اندازه ذرات، وزن مخصوص خوراک افزایش و سرعت عبور بالطبع افزایش می یابد. در این حالت هضم میکروبی کم و خوراک به سمت هضم ترشحی در سایر نقاط دستگاه گوارش سوق داده می شود. اندازه ذراتی که سبب عبوری شدن عناصر غذایی می شود (ذرات غذایی کمتر از ۱/۲ میلی متر طول و با وزن مخصوص ۱/۴-۱/۲ گرم بر سانتی متر مکعب) در مواد متراکم بیشتر مشاهده می گردد. اندازه ذرات همواره براساس شناوری و رسوب گذاری آنها در مناطق مختلف شکمبه (شکل ۱-۲) جهت نشخوار، تخمیر و عبور مورد بحث قرار می گیرد. میزان خوراک مصرفی همواره تابع تنظیمات گرسنگی- سیری و میزان فرآوری آنها می باشد که می تواند بطور مستقیم بر هضم مواد غذایی اثر بسزایی داشته باشد. اما اصولا انرژی تامینی و تعادل مواد مغذی کنترل کننده مصرف خوراک است که در پشت پرده گرسنگی و سیری قرار می گیرد.



شکل ۱-۲ محل قرار گیری ذرات غذایی براساس وزن مخصوص.

افزایش مصرف خوراک سبب عبوری تر شدن مواد جهت بدست آوردن انرژی بیشتر می شود. عبوری تر شدن مواد میزان نرخ هضم میکروبی را کاهش و نرخ هضم ترشحی را تا حد معینی افزایش و سپس کاهش می دهد. اما در نهایت افزایش مصرف سبب کاهش نرخ هضم در کل دستگاه گوارش می گردد. فرآوری کردن مواد غذایی هم براساس نوع فرآوری اثرات مهمی در هضم خوراک خواهد داشت. یعنی هر عملی که سبب پایداری خوراک در شکمبه گردد نرخ هضم میکروبی را افزایش و نرخ هضم را در کل دستگاه گوارش مطلوب تر می کند. فرآوری خوراک بطور مستقیم بر مصرف خوراک اثر گذاشته و از این طریق بطور غیرمستقیم بر هضم مواد مغذی اثر می گذارد.

قدرت چسبندگی میکروب ها و آنزیم های ترشحی اثر مهمی در هضم و تجزیه پذیری مواد غذایی دارد، که هر دو تابع محیط شکمبه و خاصیت فیزیکی و شیمیایی خوراک قرار دارند. هر چقدر میزان

اتصال ناشی از تبادل کاتیون های موجود در خوراک مانند منیزیم و سدیم با آنزیم های هضمی بیشتر باشد، نرخ هضم و تجزیه پذیری بیشتر می گردد. این فاکتور به طور مستقیم تحت تاثیر کمیت و کیفیت خوراک مصرفی بوده و از همین طریق میزان هضم را کنترل می کند.

محیط براساس دما و طول روز می تواند میزان هضم مواد مغذی را براساس مقدار مصرف و نرخ عبور تنظیم نماید. با فرض ثابت ماندن حجم شکمبه در فصول سرد جهت تامین انرژی لازم خوراک بیشتری مصرف و در گرما بالعکس آن اتفاق می افتد. خوراک بیشتر در صورت کاهش دما سبب افزایش حرکات شکمبه و نهایتا کاهش هضم مواد غذایی مصرف شده می شود. البته شرایط فوق زمانی صحیح است که دام، نرخ عبور خود را ثابت و آنرا کاهش ندهد. گاهی دیده می شود به دلیل کمبود خوراک براساس شرایط فصلی، میزان نگهداری خوراک در شکمبه افزایش و نرخ عبور کاهش می یابد که بالطبع نرخ هضم میکروبی و ترشحی با این شکل افزایش خواهد داشت. اما با کاهش حجم شکمبه در زمستان دام نرخ عبور خود را افزایش تا بتواند خوراک بیشتری مصرف تا انرژی لازم خود را بدست آورد. این عمل سبب کاهش نرخ هضم در شکمبه و دستگاه گوارش می گردد.

عوامل حیوانی از طریق نژاد، جنس، وزن، سن، گونه، اندازه حیوان، دستگاه عصبی-هورمونی و دستگاه گوارشی مانند شکمبه بر میزان هضم و تجزیه پذیری میکروبی اثر می گذارد. دام هایی با جثه و دستگاه گوارش کوچکتر به دلیل متابولیسم بالا به ازای هر واحد وزن متابولیکی باید موادی مصرف کنند که انرژی بیشتری بدست آورند. در صورت عدم انرژی کافی در خوراک، خوراک مصرفی آنها بیشتر و نرخ عبور مواد در آنها بالاتر می رود. این روند سبب کاهش نرخ هضمی در آنها می گردد. این روند با نوع خوراک موجود در منطقه منطبق و تنوع دامی را بوجود می آورد. بطور مثال؛ دام های آسیایی به دلیل نوع خوراک خشبی تر از دام های اروپایی شکمبه بزرگتری دارند. لذا نرخ عبور آنها و میزان مصرف آنها به شدت با هم متفاوت خواهد بود. دستگاه عصبی- هورمونی هم تابع شرایط فیزیولوژیکی دام (آبستنی، شیرواری، فحلی، خشکی) و حتی طول روز می باشد. آبستنی سبب کاهش حجم شکمبه و افزایش نرخ عبور شده و میزان نرخ هضمی را کاهش می دهد. هورمون های استروژن، پروژسترون و پرولاکتین در حجم دستگاه گوارش و نرخ عبور موثر هستند.

تولیدات ناشی از تجزیه می تواند به صورت بازتاب عصبی- هورمونی بر هضم سایر مواد مغذی وارد شده اثر منفی یا مثبت داشته باشند. این تولیدات تابع خاصیت فیزیکی و شیمیایی خوراک هستند. فرآورده های نهایی هضم براساس تغییر فشار اسمزی و اسیدیته میزان مصرف و نهایتا میزان نرخ هضم را کنترل می کنند. به طور مثال؛ اگر pH شکمبه به ۴ و کمتر از آن سقوط کند، دستگاه عصبی مختل و

میزان حرکات شکمبه کاهش می یابد. در نهایت میزان نرخ عبور کم و هضم مواد متوقف می شود. و یا فشار اسمزی بالا سبب اختلال فعالیت میکروبی شده و هضم را کاهش می دهد.

قابلیت هضم مواد مغذی و اثرات آنها بر یکدیگر یکی از عوامل اصلی در هضم خوراک شناخته می شود. افزایش مواد سریع الهضم می تواند به دلیل افزایش اسیدیته شکمبه اختلالات هضمی در بعضی از مواد غذایی ایجاد نماید. مشهورترین این اثرات تاثیر فراوانی دانه های حاوی نشاسته بالا و سریع الهضم جو بر روی هضم سلولز است که مقدار هضم و تجزیه پذیری آن را به شدت کاهش می دهد. اسیدیته براساس اسیدهای چرب فرار تولید شده ناشی از تخمیر میکروبی بر روی مواد سریع الهضم، بافرهای وارد شده از طریق بزاق و حضور بافرهای موجود در خوراک تغییر می یابد. مهمترین اسیدهای چرب فرار موثر بر اسیدیته شکمبه بوتیرات و پروپیونات و اثر گذارترین بافرها شامل بیکربنات ها، فسفات ها و پروتئین های خاص در بزاق و اکسید منیزیم، جوش شیرین(کربنات سدیم) و آهک در جیره می باشد. همچنین حضور نمک های خاص کلسیمی سبب عبوری شدن چربی ها از شکمبه شده و هضم آنها را در شکمبه کاهش می دهد. از طرف دیگر بیش بود چربی ها می تواند اثر منفی در هضم میکروبی مواد قندی و سلولزی از طریق ایجاد پوشش کاذب بر روی آنها داشته باشد.

تنوع میکروارگانیسمی همانند موارد ذکر شده اثر بسزایی در هضم و تجزیه پذیری مواد مغذی در شکمبه و نگاری دارد. تنوع میکروبی تابع زیستگاه جانوری و کمیت و کیفیت خوراک مصرفی است. در اثر فعالیت سریع و تند یک گونه از میکروارگانیسم ها بر روی مواد خوراکی خاص، اجازه فعالیت موثر را از سایر گونه های میکروبی گرفته و یا سبب فعالیت یک گونه منحصر بفرد دیگر می شود. به طور مثال، استفاده از اقلام سهل الهضم مانند مواد متراکم می تواند فعالیت جمعیت باکتری های آمیلولایتیک را افزایش دهد و بالطبع فشار اسمزی افزایش یابد (بیشتر از ۳۵۰ میلی اسمز در هر لیتر). با بالا رفتن فشار اسمزی، فعالیت باکتری های سلولایتیک کاهش یافته و فعالیت پروتوزوآها افزایش می یابد. و یا استفاده از علوفه با فیبر بالا سبب افزایش باکتری های سلولایتیک و قارچ ها می گردد. حضور باکتری ها سلولایتیک، فعالیت و تعداد باکتری های متانوژنیک را افزایش می دهد. افزایش یا کاهش هر گونه میکروارگانیسمی سبب تغییر نرخ هضم و تجزیه پذیری هر یک از عناصر غذایی موجود در خوراک می شود.

۲-۲-۲ هضم آنزیمی

خوراک و آب وارد شده به شکمبه پس از هضم میکروبی از راه های مختلفی شکمبه را ترک نموده و وارد هضم آنزیمی می شوند. اولین نقطه در هضم آنزیمی، شیردان است که فعالیت آن شبیه

معده واقعی می باشد. یعنی همانند معده واقعی دارای فعالیت موکوسی در ناحیه فوندیک، ترشحات اسیدکلریدریک از سلول های جانبی و ترشحات پپسین از سلول های اصلی می باشد. همچنین در ناحیه پیلوریک شیردان، ترشحات موکوسی و آلکالینی دیده می شود که جهت تصحیح اسید شیردان کاربرد دارند. اما باید در نظر داشت که میزان هضم مواد غذایی در شکمبه توسط میکروب ها عاملی در مقدار ترشحات شیردان و دیگر قسمت های دستگاه گوارش می باشد. در حقیقت مشخص شده است که میزان ترشحات شیردان و روده کوچک به میزان در دسترس بودن مواد غذایی خرد شده در شکمبه و ادامه نوع هضم آن می باشد. مهمترین فاکتور تنظیم میزان ترشحات آنزیمی در شیردان میزان ترشحات موکوسی است. خود این ماده تحت تاثیر نوع ترکیبات شیمیایی غذا و مقدار آن می باشد. تحقیقات نشان داده است که بیشترین ترشحات هضمی دستگاه گوارشی نشخوارکنندگان در مواد خوراکی آرد شده خواهد بود. اما خالی بودن قسمت های پیشین دستگاه گوارش (شکمبه، نگاری، هزارلا و دهان و مری) هم از عوامل مهم در میزان ترشحات هضمی دستگاه گوارش بخصوص اسید در شیردان و قلیا در ابتدای روده کوچک (دوازده) می باشد. باید عنوان نمود که فعالیت ترشحات هضمی از اولین مصرف خوراک بعد از تولد آغاز می شود که در ۱۰ تا ۷۲ ساعت اول این میزان به ۵۰ درصد کل ترشحات واقعی می رسد. از آنجا که هضم پروتئین به شدت مدیون فعالیت های ترشحی شیردان می باشد، لازم است جهت هضم این ماده حیاتی برای رشد، فعالیت ترشحی واقعی شیردان از ابتدای تولد جهت کسب پروتئین شیر آغاز گردد.

دومین نقطه در هضم آنزیمی، روده کوچک می باشد که فعالیتی بسیار پیچیده و در همه موجودات تقریبا مشابه و یکسان است. فعالیت های آنزیمی این بخش از دستگاه گوارش به مدد ترشحات کبد (از طریق کیسه صفرا)، پانکراس و سلول های ترشحی موکوس در دیواره روده کوچک انجام می گیرد. ترشحات کیسه صفرا و پانکراس در ابتدای روده کوچک (دوازده) توسط مجراهای کوچکی وارد می شود. بیشترین بخش آنزیمی و هضمی مواد غذایی توسط ترشحات سلول های میانی بنام غدد برونر در دیواره دوازده انجام می گیرد. این غدد هم ترشحات موکوسی همانند سایر سلول های ترشحی روده را دارا هستند. به دلیل آنکه ترشحات اسیدی در بخش اولیه دستگاه گوارش بالا می باشد، برای خنثی سازی آن جهت جلوگیری از آسیب های گوارشی ترشحات قلیایی پانکراس و بخصوص صفرا اهمیت فراوانی پیدا می کنند. ارزش این ترشحات در میزان کنترل اسیدیته بسیار بالا بوده و می توانند میزان آن را از $pH = ۲$ به $pH = ۷$ ارتقا دهند و محیط را برای فعالیت سایر آنزیم های ترشحی خنثی نمایند. آنزیم های آمیلولیتیک، لیپولیتیک و پروتئولیتیک موجود در ترشحات پانکراس فقط در اسیدیته خنثی فعالیت می نمایند. ترشحات صفراوی بیشتر شامل موکوس، الکترولیت ها، نمک ها به خصوص نوع سدیم دار

آن و رنگدانه های مختلف (بیلی روبین و بیلی وردین) می باشند. نمک های موجود در ترشحات صفراوی جهت ریز کردن چربی در شیرابه و حل کردن آن کاربرد داشته و فعالیت های لیپاز را پر قدرت تر می نماید. البته باید عنوان نمود که ۹۵ درصد نمک مزبور در ایلئوم جذب و به کبد ارسال می گردد. این بازگردش تاثیر اصلی را در میزان ترشحات هضمی خواهد داشت. البته کیفیت و کمیت ترشحات همواره تابع نوع ماده هضمی داخل روده دارد. بطور مثال؛ ورود مواد پروتئینی زیاد جیره سبب ازدیاد ترشح اسیدکلریدریک در شیردان و و افزایش ترشح بی کربنات و آب از کیسه صفرا و پانکراس در دوازده می شود.

علاوه بر تحریکات مواد غذایی وارد شده در دستگاه گوارش جهت ترشح شیرابه های هضمی، تحریک دستگاه عصبی بخصوص عصب واگ هم در این ترشحات بی تاثیر نیست. اگر چه تحریک عصب واگ در فعالیت های گوارشی متنوع می باشد، اما بیشترین اثر آن در ترشحات هضمی روی پانکراس است. البته تحریکات عصبی در ترشح موکوس در کل دستگاه گوارش نقش اساسی را بازی می کند. موکوس ترشح شده علاوه بر حفاظت بیشتر دستگاه گوارش از بخش های آنزیمی، اسیدی و بازی، سبب تسهیل حرکت مواد غذایی در معده و روده ها می شود.

تنوع ترشحات آنزیمی در دستگاه گوارش به عوامل مختلفی وابسته است. اما مهمترین آنها شامل: سن دام، قابلیت تولید در دستگاه گوارش، طول دستگاه گوارش و محل بررسی آنزیم و نوع جیره مصرفی می باشد. بطور مثال؛ وجود آنزیم های مالتاز، لاکتاز و ایزومالتاز در بین دام ها مختلف گزارش شده است که می تواند ناشی از فعالیت بخش مسواکی روده (سلول های پرز مانند در سطح روده) در بخش ژئوژنوم و تا حد کمی دوازده باشد. لاکتاز از دسته آنزیم های است که به شدت تابع سن و قدرت عادت پذیری دام می باشد. همچنین طول دستگاه گوارش و مکان هضم از مهمترین موارد در تنوعات فعالیت های آنزیمی مورد بررسی است. بطور مثال؛ بیشتر فعالیت آنزیم های تریپسین، کیموتریپسین و کربوکسی پلی پپتیداز مترشحه از پانکراس خارج از ناحیه دوازده انجام می گیرد. این در حالی است که مکان ترشح آنها در دوازده می باشد. یکی از عواملی که سبب این تفاوت در مکان ترشح و محل فعالیت آنزیم می گردد، اسیدیته روده است. اسیدیته خنثی مهمترین شرط مورد نیاز جهت فعالیت آنزیمی است. اسیدیته دوازده بین ۲/۶ تا ۵/۱، اسیدیته ژئوژنوم بین ۶ تا ۷ و اسیدیته ایلئوم بین ۷/۸ تا ۸/۲ می باشد.

۳-۲ جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان

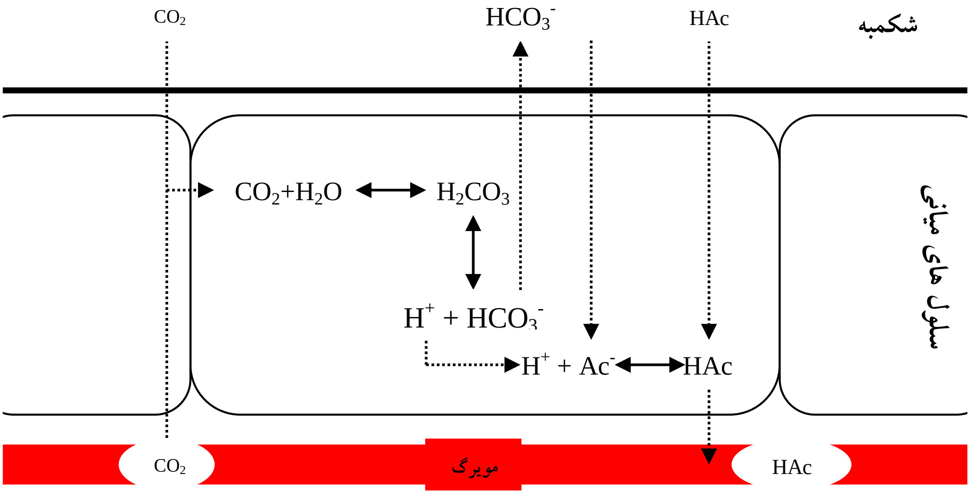
روند جذب را می توان در دو بخش مجزا مورد بررسـی قـرار داد. جـذب مـواد تخمیـری در بخـش ابتدایی دستگاه گوارش به نام روند جذب شکمبه- نگاری و جـذب سـایر مـواد غـذایی در بخـش هـای دیگر دستگاه گوارش به نام روند جذب روده ایی می باشد.

۱-۳-۲ جذب شکمبه – نگاری

اگر چه روند هضم در بخش شکمبه، نگـاری و هـزارلا متفـاوت از سـایر رونـدهای هضـمی بـوده و توسط میکروب ها انجام می شود، اما برای پویایی و فعالیت مستمر همین میکروب ها لازم است که مواد تخمیری آنها از محوطه شکمبه – نگاری خارج تا تخمیر ادامه یابد. بدین منظور شکمبه، نگاری و هزارلا دارای خصوصیات جذبی شدند که بتوانند علاوه بر آبگیری فراوان در هـزارلا، اسـیدهای چـرب فـرار و آمونیاک در شکمبه – نگاری را جذب و از معده تخمیری خارج شـوند. جـذب اسـیدهای چـرب فـرار (اسید پروپیونیک، اسید استیک، اسید بوتیریک، اسـید والریـک و سـایر اسـیدهای تولیـدی) مـی توانـد اسیدیته شکمبه را در حد مطلوب (pH بین ۶ تا ۷) نگاه دارد. این روند سبب برقـراری نظـم در تخمیـر و تولید بیشتر اسیدهای چرب فرار مورد نیاز دام و کارآیی بهتر خوراک می شود. اما روند جذب اسیدهای چرب فرار براساس افزایش تراکم آن اسیدها در دو طرف غشـای جـذبی معـده تخمیـری صـورت نمـی گیرد. یعنی مدرکی دال بر اثر غلظت جهت انتقال اسیدهای مزبور از شکمبه – نگاری به خـون نیسـت و در اصل انتقال به صورت یک طرفه می باشد. این روند جذب تحت اثر سه فرآیند مهـم یعنـی اسـیدیته، اسمولالیته و زنجیره انتقال اسید فعال می باشد. با کاهش میزان pH شکمبه که ناشی از تجمـع اسـیدهای چرب فرار آزاد در شکمبه است، نرخ جذب اسیدهای چرب فرار افـزایش مـی یابـد. البتـه بایـد در نظـر داشت که افزایش بیش از حد اسیدیته (کاهش pH به زیر ۵) سبب کاهش جذب اسیدهای چـرب فـرار آزاد شده و این عامل سبب بروز اسیدوز می شود. بعبارت دیگر هر بار pK_a محتویات شکمبه از ۴/۸ بـه پایین تر سقوط کرد قدرت جذب اسیدهای چرب فرار کمتر شده و در ۳/۲ متوقف می شـود. بـه همـین دلیل نوع اسید چرب که سبب تغییر اسیدیته شکمبه می شود، در میـزان جـذب اثـر فراوانـی دارد. بطـور مثال؛ اسید لاکتیک به دلیل pK_a کمتر در هنگام تجمع در شکمبه اثـر منفـی تـری در جـذب اسـیدهای چرب فرار دارد. در حالیکه تجمع اسید استیک اثرات نامطلوب کمتری بر میزان جذب خواهد داشت.

نهایتا نرخ جذب با افزایش نوع اسیدهای چرب، اسـتیک < پروپیونیـک < بوتیریـک متغیـر خواهـد بود. علاوه بر موارد فوق زنجیره انتقال اسید، فعالیت گسترده خود را به صورت مشارکتی با کـاهش pH شروع خواهد کرد و جذب اسیدهای چرب فرار بیشتر می شود. با ایـن ترتیـب بـا تولیـد کمتـرین میـزان اسیدهای چرب فرار آزاد، روند جذب فعال و همان اندک اسید تولیدی هم جذب می گردد. اسمولالیته

هم براساس تغییرات فشار اسمزی سبب ورود و خروج آب از غشای دیواره شکمبه می شود که می تواند تاثیر عمده ایی در جذب اسیدهای فرار داشته باشد. حضور یون بی کربنات هم براساس شکل ۲-۲ تاثیر عمده ای بر جذب اسیدهای چرب فرار خواهد داشت. برای تامین یون بی کربنات لازم است که دی اکسیدکربن مورد نیاز از طریق خون و گازهای تولیدی شکمبه تامین و اسید کربنیک لازم در سلول های میانی ساخته شود. پس از تجزیه اسیدکربنیک ساخته شده توسط کربنیک آنهیدراز، بی کربنات مزبور در سلول میانی ساخته و سبب تامین اسیدیته مطلوب در شکمبه می شود. البته یون بی کربنات توسط بزاق هم تولید و به شکمبه اضافه می گردد. هیدروژن تولید شده از آنزیم کربنیک آنهیدراز سبب انتقال اسیدهای چرب فرار می شود. اعتقاد بر این است که ۵۰ درصد اسیدهای چرب فرار بدین روش خنثی و منتقل می گردند.



شکل ۲-۲ الگوی انتقال اسیدهای چرب فرار در سلول های اپیتلیال شکمبه.

جهت پویایی شکمبه لازم است علاوه بر جذب اسیدهای چرب فرار، آمونیاک تولید شده جهت بازسازی دوباره پروتئین و گردش صحیح آن در بدن و کاهش مسمومیت آمونیاکی جذب گردد. آمونیاک موجود در شکمبه ناشی از فعالیت میکروبی بر روی پروتئین های حقیقی و غیر حقیقی مصرفی و یا سایر نیتروژن ها مانند نیتروژن داخلی تولید شده است. از آنجا که مهمترین و بیشترین پروتئین مورد نیاز دام از طریق پروتئین میکروبی تهیه می شود، لازم است پروتئین مصرفی در اختیار میکروارگانیسم ها قرار گرفته تا پس از تجزیه آن پروتئین مورد نیاز میکروب ها ساخته شود. در طی روند تجزیه و ساخت مجدد پروتئین ها، آمونیاک تولید می گردد. غلظت مناسب آمونیاک تولیدی براساس نوع خوراک

مصرفی و ماده آلی قابل تخمیر متفاوت بوده و دامنه ۸۵ تا نزدیک ۳۰۰ میلی گرم در لیتر را شامل می شود. در هنگام بیش بود آمونیاک در شکمبه نوع جذب بصورت انتشار و تابع غلظت از طریق دیواره شکمبه به خون صورت می گیرد. البته میزان جذب به طور حتم با مقدار اسیدیته شکمبه ارتباط مستقیم داشته و این ارتباط براساس تشکیل یون آمونیوم (معادله ۱-۲) دیکته می شود. در اصل آمونیاک به صورت یک باز ضعیف عمل نموده و سبب خنثی سازی یون هیدروژن تولیدی در شکمبه می شود. pK_a لازم برای تعادل معادله ۱-۲ جهت تشکیل آمونیوم از آمونیاک و بالعکس، ۹ می باشد. پس با این ترتیب می توان گفت جهت کنترل آمونیاک آزاد و تبدیل آن به یون آمونیوم لازم است محیط شکمبه اسیدی شود.

معادله ۱-۲: $NH_3 + H^+ \leftrightarrow NH_4^+$

سرعت انتشار آمونیاک نسبت به یون آمونیوم بیشتر بوده و تبدیل شدن آمونیاک به یون مذکور سبب کاهش میزان مسمومیت آمونیاکی می شود. البته در صورت افزایش میزان pH شکمبه مقدار آمونیاک تولیدی بیشتر و جذب آن از دیواره شکمبه نیز بیشتر می شود. بطور مثال؛ نرخ جذب آمونیاک از دیواره شکمبه در۶/۵ = pH سه برابر بیشتر از ۴/۵ = pH **می باشد.** در نهایت می توان گفت که اسیدیته شکمبه که ناشی فعالیت میکروبی متغیر بوده و بیشتر تابع تجمع اسیدهای چرب فرار است، بر جذب و عدم جذب آمونیاک و میزان مسمومیت آن موثر خواهد بود. علاوه بر آمونیاک تعدادی از پپتیدها که وزن ملکولی پایینی دارند می توانند از دیواره شکمبه و بخصوص شیردان جذب شوند. افزایش اسیدیته این جذب را افزایش می دهد.

۲-۳-۲ جذب روده ایی

هضم و جذب مواد غذایی در روده ها بخصوص در روده کوچک تقریبا بصورت کامل انجام می گیرد. بطور مثال؛ مواد قندی محلول به جا مانده از معده تخمیری و اقلام تخمیری حاصل از قندها کاملا در روده جذب می گردند. در هنگام مصرف مواد متراکم در مقیاس بالا، مقداری از قندها (بیش از ۴۰ درصد) به صورت نشاسته از تخمیر شکمبه ای فرار کرده و به روده ها می رسد. این عامل سبب هضم و جذب قندها در بخش روده ای بخصوص تشکیل گلوکز و جذب آن می شود. قندهای ترکیبی مانند نشاسته مورد هضم آنزیم های مترشحه از پانکراس و آمیلاز روده قرار می گیرند. این آنزیم ها سبب تولید انواع مونوساکارید بخصوص گلوکز شده که قدرت جذب آنها از روده بسیار بالا بوده و به صورت فعال و با کمک سدیم جذب می شوند. جذب فعال با سدیم همچنان از مسائل بحث برانگیز و مورد اختلاف کارشناسان می باشد. مونوساکاریدها توسط یکسری باندهای خاص حمل ملکول به

دیواره سلولی چسبیده و وارد سلول می شوند. این باندها توسط سدیم کنترل و تنظیم می گردند. باند مذکور را یک پمپ سدیم – پتاسیم در غشای سلولی می نامند. این نوع انتقال هیچ ارتباطی با غلظت ماده قابل حمل نداشته و جهت انتقال همواره یک طرفه به داخل رگ ها می باشد.

هضم چربی ها و تغییر کیفیت آن در حیوانات تک معده ای بیشتر در دوازده و توسط ترشحات صفراوی ناشی از کبد اتفاق می افتد. این در حالی است که کیفیت زنجیره های اسید چرب و ترکیب شیمیایی آنها تحت تخمیر میکروبی در شکمبه تغییر یافته و سپس به دوازده می رسند. تغییرات یاد شده شامل (۱) هیدرولیز تری گلیسریدها، گالاکتوگلیسریدها و سایر اسیدهای چرب (۲) هیدروژنه شدن اسیدهای چرب غیر اشباع و (۳) سنتز میکروبی اسیدهای چرب، می باشد. اما با همه تغییرات کیفی چربی ها در معده تخمیری هضم قابل محسوسی در زمینه اسیدهای چرب زنجیر بلند در شکمبه دیده نشده و مدرکی دال بر جذب اسیدهای زنجیر بلند در دیواره شکمبه ارائه نشده است. به همین دلیل می توان گفت جذب چربی های سنگین در نشخوارکنندگان و سایر موجودات تقریبا مشابه و در روده ها می باشد. ۷۰ تا ۸۰ درصد چربی های وارد شده به شیردان و دوازده توسط میکروب ها در شکمبه سنتز شده اند. مقدار باقیمانده شامل اسیدهای چرب استریفه و فسفوگلیسریدها از شکمبه فرار کرده و تخمیری روی آنها صورت نمی گیرد. این ۲۰ درصد توسط شیرابه های صفراوی هضم و نهایتا با سایر اسیدهای چرب ساخته شده در روده توسط لیپاز و نمک های صفراوی خرد و به صورت ذراتی محلول درآمده و آماده جذب می شوند. جهت جذب چربی ها لازم است که ابتدا به ساده ترین جزء عناصر سازنده خود تبدیل و سپس جذب گردند. اسیدهای چرب آزاد ساده ترین جزء چربی ها می باشند که توسط میکروویلی های روده جذب سلول ها می شوند. جذب اسیدهای چرب آزاد بیشتر در نیمه روده کوچک (ژئوژنوم) اتفاق می افتد و جذب در انتهای ژئوژنوم و بخش ایلئوم به صفر نزدیک می شود. پس از جذب عناصر خرد شده چربی (مانند اسیدهای چرب و سایر اجزای سازنده)، چربی ها وارد رگ های لنفاوی می شوند و به صورت لیپوپروتئین و شیلومیکرون (۷۰ تا ۸۰ درصد تری گلیسرید و ۲۰ درصد فسفولیپید و مقدار کمی کلسترول و استرهای آن می باشد) انتقال می یابند. پس باید عنوان نمود که تجزیه چربی ها فقط جهت جذب آنها می باشد. اما عامل اصلی حرکت اسیدهای چرب در بدن گلیسرول بوده که بدلیل مقدار کم آن در روده جهت جذب لازم است از منشاء داخلی و توسط چرخه گلیکولایتیک درون سلول های روده تامین گردد.

جهت بررسی جذب پروتئین ها لازم است بدانیم که این دسته از مواد غذایی موجود در روده از کجا حاصل شده اند. پروتئین روده از سه منبع اصلی (۱) پروتئین جیره که از تخمیر میکروبی فرار کرده است (۲) پروتئین های تشکیل شده از سنتز میکروبی مانند توده انبوه باکتری ها و پروتوزوئرها و (۳)

پروتئین هایی با منشاء داخلی که از شیردان، شکمبه و سایر نقاط دستگاه گوارش به شیرابه غذایی وارد شده است، تشکیل می گردند. جهت جذب پروتئین ها همانند چربی ها لازم است که ابتدا به عناصر سازنده پروتئین مانند اسیدهای آمینه تجزیه شوند. این نوع روند جذب در همه موجودات جز حیوانات شیرخوار متولد شده در ۲۴ ساعت اول که پروتئین (ایمونوگلوبولین ها) را بصورت کامل جذب می نمایند، مشترک می باشد. پروتئین های وارد شده به روده تحت تاثیر پروتئازها شکسته و به پپتیدها تبدیل می گردند. جهت این عمل لازم است که اسیدیته روده مطلوب باشد. لذا بیشترین جذب پروتئین ها و یا عناصر سازنده آن در ژئوژنوم و ایلئوم اتفاق می افتد. در این زمینه مدارک دیگری ارائه شده است که نشان می دهد ۶۰ درصد جذب اسیدهای آمینه در انتهای دوازده اتفاق افتاده است. مکانیسم جذب همانند قندها متکی به پمپ سدیم- پتاسیم می باشد و این نوع فعالیت براساس شیب غلظتی سدیم کنترل می شود. روند جذب به طور ثانویه و براساس ترکیب سدیم با اسیدآمینه و انتقال آن به درون سلول بصورت فعالانه و با صرف انرژی همراه می شود. در قبال این جابجایی یون پتاسیم خارج می گردد. برای جذب اسیدهای آمینه چهار مکانیسم قطعی پیشنهاد شده است که عبارتنداز (۱) مکانیسم حمل اسیدآمینه های خنثی با زنجیره جانبی بلند (۲) مکانیسم حمل اسیدآمینه های خنثی با زنجیره جانبی کوتاه (۳) مکانیسم حمل اسیدآمینه های بازی یا قلیایی و (۴) مکانیسم حمل اسیدآمینه های اسیدی، می باشد. البته گاه این مکانیسم ها را به شش گروه طبقه بندی می کنند که باز بر اساس چهار گروه موجود شکل گرفته است. بطور مثال؛ اسیدآمینه پرولین که مکانیسم جذبی خاص خود را دنبال می کند. سرعت جذب اسیدهای آمینه متفاوت و به صورت ذیل مورد بررسی قرار گرفته است که شامل:

- بسیار زیاد: ایزولوسین، آرژنین، متیونین و والین.
- زیاد: لوسین، لیزین و فنیل آلانین.
- خوب: آسپارتیک اسید، سرین، تیروزین و آلانین.
- متوسط: پرولین و ترئونین.
- کم: هیستیدین و اسید گلوتامیک
- خیلی کم: گلیسین

گاهی هم بجای اسیدهای آمینه عناصر پروتئینی دیگر مانند پپتیدهای کوچک جذب می شوند که میزان سرعت جذب آنها در روده کوچک بالا می باشد. نهایتا، اسیدهای آمینه و پپتیدهای گروه D جذب روده ها شده و گروه L کمترین مقدار جذب و یا عدم جذب در آن دیده می شود.

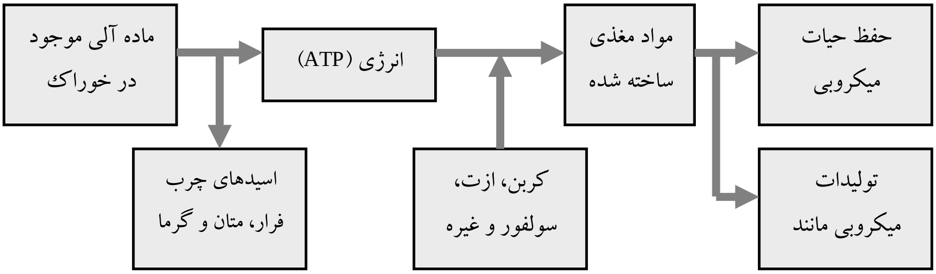
۲-۴ متابولیسم در شکمبه

متابولیسم شامل فرآیندهایی است که سبب ساخته شدن و یا تجزیه یک ماده مغذی می شود، را گویند. مجموعه روندهایی که سبب تجزیه یک ماده مغذی به عناصر سازنده آن می شود را کاتابولیسم و مجموعه روندهایی که سبب ساخت یک ماده مغذی از عناصر سازنده آن می شود را آنابولیسم می گویند. در نتیجه روندهای متابولیسمی مختلف انرژی عامل اصلی در ساخت مایحتاج میکروارگانیسم های شکمبه می باشد. جهت بررسی هر چه بیشتر تاثیر مواد مغذی بر فرآیندهای تولید و نگهداری میکروب ها لازم است که ابتدا شناخت اجمالی درباره متابولیسم انرژی و سپس ساخت و تجزیه کربوهیدرات، پروتئین، چربی، مواد معدنی و ویتامینی داشته باشیم.

۱-۴-۲ انرژی

حیوانات تنها برای تولیدات خود مانند تولید گوشت و شیر، رشد بدن و تولیدمثل انرژی مصرف نمی کنند، بلکه جهت نگهداری بدن و تداوم عمل میکروارگانیسم های شکمبه همانند سایر عناصر غذایی نیاز به انرژی کافی و قابل متابولیسم دارند. میزان انرژی ابقا شده جهت تولیدات دامی بسیار کم و بطور متوسط در شرایط مختلف آب و هوایی کمتر از ۱۶ درصد کل انرژی خام مصرفی می باشد. اما همین مقدار انرژی ابقا شده در بحث میکروارگانیسم ها بیش از ۵۰ درصد است. این مطلب نشان می دهد که سه اصل اساسی درباره انرژی و متابولیسم آن وجود دارد که شامل (۱) فراهم کردن انرژی برای نگهداری و تولید میکروارگانیسم ها کم هزینه تر از سایر مواد مغذی مصرفی می باشد، (۲) ابتدایی ترین فاکتور جهت بررسی کارآیی خوراک مصرفی در تولیدات میکروبی، کنترل انرژی و مقدار حضور آن در تولیدات است و (۳) کارآیی تبدیل انرژی به تولیدات مورد نیاز انسان در نشخوارکنندگان کم است، لذا کنترل روند مصرف انرژی باید گسترده تر باشد. تغییر چرخه انرژی در شکمبه تقریبا به دلیل شرایط بی هوازی و تنوع و تراکم میکروارگانیسم ها سخت قابل شناسایی و رهگیری است. اما چرخه های مزبور دارای قدرت تغییر حرکت در جهت های مختلف می باشد. از آنجا که انرژی به صورت یک ماده تنها وجود ندارد و همواره در قالب یک ماده دیگر وارد بدن می شود و حرکت می کند، لازم است جهت تعیین مسیر آن از مواد غذایی مصرفی کمک گرفته شود. بطور مثال؛ برای تعیین مقدار هدر روی انرژی از شکمبه و یا چرخه آن لازم است میزان دفع متان و حرارت بررسی شود. و یا مقدار کارآیی این ماده را براساس تولید اسیدهای چرب فرار و اسیدهای آمینه مطلوب در شکمبه مورد آنالیز و اندازه گیری قرار داد. همچنین جهت بررسی اثر انرژی در شکمبه بهتر است به میزان تغییرات گونه میکروبی شکمبه و یا تغییر نسبت های تولیدی توجه کافی نمود. لذا مهمترین سیاست مصرف انرژی در شکمبه تداوم حضور میکروارگانیسم و افزایش فعالیت مورد نیاز آنها جهت تولید یک ماده خاص می باشد.

انرژی موجود در خوراک بوسیله شکسته شدن مواد غذایی توسط میکروارگانیسم ها به صورت ATP آزاد و جهت ساخت مواد مغذی مورد نیاز میکروب ها و در ساخت اسیدهای چرب فرار، متان و گرما مصرف می شود. انرژی آزاد شده جهت حفظ و نگهداری و تولیدمثل میکروارگانیسم های شکمبه (شکل ۳-۲) و یا مواد مغذی مورد نیاز آنها مانند ساخت اسیدهای آمینه لازم است. فرآیند چرخه انرژی بیشتر در خارج سلول میکروبی جهت حفظ و نگهداری صورت می گیرد. بین انرژی آزاد شده ناشی از کاتابولیسم مواد مغذی و انرژی مورد نیاز جهت آنابولیسم مواد مورد نیاز میکروبی، باید حلقه اتصالی وجود داشته باشد. این حلقه بیشتر از آدنوزین تری فسفات (ATP) و گوانوزین تری فسفات (GTP) حاصل می شود. اما، اوریدین تری فسفات (UTP) و سیتیدین تری فسفات (CTP) هم در این روند کارا می باشند.



شکل ۳-۲ راهبرد متابولیسم انرژی در شکمبه.

برای تولید ATP که مهمترین ماده انرژی زا برای میکروارگانیسم ها محسوب می شود، روش های متفاوتی از مواد مغذی موجود در خوراک ها وجود دارد. بطور مثال؛ یکی از مراحل تجزیه کربوهیدرات ها، تبدیل فسفوانول پیروات به پیروات است که باعث می شود یک ملکول ATP از آدنوزین دی فسفات تولید شود. مورد فوق الذکر، روند فسفریلاسیون در سطح ماده اولیه (سوبسترا) و خارج سلول میکروبی می باشد. بیشتر میکروارگانیسم ها از روش نام برده انرژی خود را تامین می کنند. اما ممکن است ATP بصورت غیرمستقیم هم تولید گردد. بطور مثال؛ در اکسیداسیون های زیستی مانند جدا نمودن هیدروژن از یک ماده اولیه، و انتقال به اکسیژن و تولید آب، سبب انتقال الکترون و تولید ATP در سیتوکروم ها، فلاووپروتئین ها و غیره می شود. این مکانیسم را فسفوریلاسیون اکسیداتیو در سطح میتوکندری داخل سلولی میکروارگانیسم ها می نامند. بطور مثال؛ باکتری ویبریو ساکسینوژن بوسیله احیای فومارات به سوکسینات توسط آنزیم فومارت دهیدروژناز می تواند انرژی خود را تامین نماید. هر دو فسفوریلاسیون نام برده تامین کننده انرژی مورد نیاز میکروارگانیسم ها می باشد. اما میزان آزاد سازی و چرخه انرژی در شکمبه به عوامل مختلفی مانند ماهیت فیزیکی و شیمیایی مواد خوراکی،

درصد اجزای خوراک (مانند درصد مواد متراکم نسبت به علوفه)، فرآوری و فرآیند فرآوری (مثل نحوه روغن گیری از دانه های روغنی)، سطوح مصرف خوراک، عوامل فیزیولوژیک دام (مانند آبستنی)، میزان خروج و یا ابقای نیتروژن دفعی، تنوع و تراکم میکروارگانیسم های شکمبه وابسته می باشد. مهمترین منابع تامین انرژی مورد نیاز میکروارگانیسم ها به ترتیب قندها (مانند گلوکز)، پروتئین ها، چربی ها و سایر اقلام دیگر می باشد. البته به دلیل نوع خوراک مصرفی دام ها مانند کربوهیدرات های فراوان موجود در ساختار گیاهی استفاده از سایر اقلام جهت تولید انرژی کم و گاه بی ارزش محسوب می شود.

۱-۱-۴-۲ منابع انرژی

اگر چه در آزاد سازی انرژی از مواد مغذی مورد استفاده، نوع میکروارگانیسم فعال شده اهمیت زیادی دارد. اما قندهای حاصل از کربوهیدرات مصرف شده مهمترین منبع انرژی محسوب شده و پس از تجزیه شدن به واحدهای سازنده یعنی گلوکز، فروکتوز و گالاکتوز وارد مسیر تولید انرژی می گردند. گلوکز اولین واحد تولید انرژی بوده که توسط میکروارگانیسم ها در شکمبه تبدیل به ATP مورد نیاز می شوند. گلیکولیز مسیری است که در شرایط بی هوازی شکمبه و در سیتوزول میکروب ها (بخصوص باکتری ها) گلوکز را به پیروات تبدیل و در مسیر بعدی پیروات تخمیر می گردد. میزان انرژی آزاد شده در این مسیر از یک مول گلوکز ۵ ملکول ATP می باشد. این مقدار ATP تولید شده تنها ۱۵ درصد از کل ATP موجود در مسیرهای هوازی می باشد. علت اصلی آن مربوط به فقدان کامل و یا نقص در چرخه تری کربوکسیلیک در محیط بی هوازی شکمبه می باشد. لذا طی تخمیر فقط ۵ مول ATP تولید و مابقی انرژی موجود در شکمبه صرف ساخت اسیدهای چرب فرار می گردد.

بعد از گلوکز، بعلت فقدان مواد انرژی زای قابل دسترس، میکروب ها از اسیدهای آمینه و چربی ها به عنوان منبع انرژی استفاده می نمایند. میزان انرژی تولید شده از این روش کم و در هنگام تولید سریعا توسط ساخت پروتئین ها مصرف می شود. اولین مرحله در تولید انرژی جدا شدن آمین به وسیله دی آمیناسیون اکسیداتیو و ترانس آمیناسیون است. در ترانس آمیناسیون که توسط آمینو ترانسفراز ها انجام می گیرد، گروه آمینی به اتم کربن آلفا در یک کتو- اسید انتقال یافته و منجر به تولید یک کتو- اسید دیگر می شود. کوآنزیم های احیا شده در این مسیر از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو تولید ATP می کنند. مهمترین مثال در این زمینه آلفاکتوگلوتارات است که می تواند از سایر اسیدهای آمینه توسط دی آمیناسیون تولید گردد و در مسیر ترانس آمیناسیون ۳ مول ATP تولید نماید. آمونیاک تولید شده در این مسیرها هم مورد استفاده میکروب ها قرار گرفته و منتج به ساخت سلول میکروبی می شود. چربی ها بعد از تجزیه توسط لیپازهای میکروبی در شکمبه به اسیدهای چرب و گلیسرول تبدیل و وارد چرخه

تولید انرژی می شوند. گلیسرول قند ساز بوده (گلیکوژنیک) و میکروارگانیسم ها می توانند انرژی خود را از این فرآیند تولید نمایند. در این فرآیند مسیر در ابتدا انرژی گیر و سپس انرژی زا تلقی می شود.

روش های دیگری جهت تولید انرژی وجود دارند که توسط تعدادی از میکروارگانیسم ها خاص هنگام محدودیت ATP مبادرت به انجام آن می کنند. بطور مثال؛ باکتری های تولید کننده متان می توانند ATP مورد نیاز خود را از واکنش معادله ۲-۲ بدست آورند. این روندها محدود و خارج از عرف معمول جهت کسب انرژی می باشد.

معادله ۲-۲: $CO_2+4H_2+ADP \rightarrow CH_4+2H_2O+ATP$

و یا باکتری های گونه *Desulfovibrio* می توانند با احیا کردن سولفات به سولفید در معادله ۳-۲ توسط انتقال الکترون که همواره برگشت پذیر می باشد، یک مول ATP تولید نماید.

معادله ۳-۲: $4H_2+SO_4^{-2}+2H^{+}+ADP \rightarrow H_2S+ 4H_2O+ATP$

همچنین بعضی باکتری ها مانند آنایرووبیرولیپولتیکا (*Anaerovibrio lipolytica*) و سلنوموناس رومینانتیوم (*Selenomonas ruminantium*) می توانند با احیای نیترات به نیتریت توسط انتقال الکترون که همیشه برگشت پذیر می باشد، ATP خود را تولید نمایند.

۲-۱-۴-۲ کارآیی انرژی (Y_{ATP})

براساس چرخه های بیوسنتز موجود در شکمبه می توان ارزش تولیدی و کارآیی انرژی را تعیین نمود. کارآیی انرژی عبارتنداز گرم ماده خشک سلول میکروبی به ازای هر مول ATP را گویند. براساس اطلاعات موجود میزان سنتز میکروبی بین ۱۰ تا ۲۵ گرم سلول میکروبی خشک شده به ازای هر مول ATP متغیر است (جدول۱-۲). میزان انرژی مورد استفاده در شکمبه به رشد و تراکم میکروب ها در هنگام تخمیر وابسته بوده و ارزش کارآیی انرژی آزاد شده در شکمبه را می توان براساس تولیدات میکروبی محاسبه نمود.

میکروارگانیسم های که برای تولید ATP و مصرف آن از دو روند فسفریلاسیون در سطح سوبسترا و فسفوریلاسیون اکسیداتیو (زنجیره انتقال الکترون) استفاده می کنند دارای کارآیی بهتری می باشند. نظریه های مختلفی جهت مشخص کردن کارآیی انرژی وجود دارد که شامل: (۱) به کاربردن معادلاتی که با دقت فراوان حرکت ها انرژی را در فعالیت های درون سلولی مشخص نماید، (۲) آنالیز دقیق از جزئیات تشکیل دهنده سلول های میکروبی و میزان انرژی لازم جهت ساخت تشکیلات آنها (ترکیب شیمیایی سلول میکروبی) و (۳) براساس مواد مغذی قابل تخمیر و هضم ظاهری آن. روش اول به دلیل تغییر مداوم روندهای متابولیسمی به دلیل ورود متنوع خوراک و فعالیت گونه های مختلف میکروبی

سخت و پیچیده می باشد. شناسایی میزان انرژی تولیدی و کارآیی آن براساس روند متابولیسمی یک گونه باکتری در آزمایشگاه امکان پذیر است، اما به دلیل عدم اثرات متقابل با سایر میکروارگانیسم ها قدرت تشخیص واقعی میزان انرژی موجود در شکمبه وجود نخواهد داشت و در صورت بررسی دقت آن کم خواهد بود. لذا برای جلوگیری از انحراف در تعیین میزان انرژی موجود در شکمبه می توان به آنالیز دقیق اجزای تشکیل دهنده باکتری ها (پروتئین، چربی، قند، DNA و RNA) بعد از مدت زمان مشخصی از مصرف خوراک مبادرت ورزید.

جدول ۱-۲ کارآیی انرژی و تعادل نیتروژن به انرژی برای رشد میکروارگانیسم های شکمبه.

Y_{ATP} (گرم سلول در هر مول ATP)	مقصد ماده خشک مصرفی: میکروب[1] (٪)	مقصد ماده خشک مصرفی: اسیدهای چرب فرار، متان و دی اکسیدکربن (٪)	کارآیی: واقعی — گرم سلول در هر ۱۰۰ گرم ماده آلی تخمیر شده[3]	کارآیی: ظاهری — گرم سلول در هر ۱۰۰ گرم ماده آلی تخمیر شده	پروتئین مورد نیاز[2] (گرم پروتئین برای هر ۱۰۰ گرم ماده آلی تخمیر شده)
۸	۲۴/۲	۷۵/۸	۲۴/۲	۳۱/۹	۱۴/۵
۱۰	۳۰/۲	۶۹/۸	۳۰/۲	۴۳/۳	۱۸/۱
۱۲	۳۶/۳	۶۳/۷	۳۶/۳	۵۷/۰	۲۱/۸
۱۴	۴۲/۳	۵۷/۷	۴۲/۳	۷۳/۳	۲۵/۴
۱۶	۴۸/۳	۵۱/۷	۴۸/۳	۹۳/۴	۲۹/۰

[1] محاسبه شده از طریق کارآیی میکروبی برحسب ۴/۹ مول ATP به ازای هر مول کربوهیدرات قابل تخمیر (۱۶۲ گرم).

[2] محاسبه شده از طریق کارآیی میکروبی و ماده آلی قابل تخمیر به صورت واقعی، برحسب اینکه ۶۰ درصد ماده خشک میکروبی پروتئین خام می باشد.

[3] مقدار ماده آلی وارد شده منهای مقدار ماده خارج شده از شکمبه را ماده آلی قابل تخمیر می گویند.

جدول ۲-۲ میزان انرژی لازم جهت تولید پلیمرهای پروتئین، چربی و کربوهیدرات را در میکروارگانیسم ها نشان می دهد. براساس افزایش تعداد میکروب ها و آنالیز ساختمان آنها می توان میزان انرژی آزاد شده از تخمیر را محاسبه نمود. اما به دلیل حرکت میکروب ها، انتقال فعال مواد در آنها و ساخت پلیمرهایی که به خارج سلول میکروبی هدایت می شوند (آنزیم ها و سایر ترکیبات)، باز تعیین میزان انرژی موجود در شکمبه از طریق آنالیز پلیمرهای میکروبی با انحرافاتی روبرو خواهد بود. از آنجا که نمی توان میزان مول ATP شکمبه را به دلیل پیچیدگی های موجود اندازه گیری نمود، لذا از قابلیت هضم ظاهری تخمیر می توان در محاسبه مول ATP استفاده کرد. همانطور که در جدول ۲-۲ نشان داده شده است بیشترین کارآیی انرژی مربوط به استفاده از سلولز به دلیل دارا بودن گلوکز کافی می باشد. لذا تولید و کارآیی انرژی از سایر منابع در محیط شکمبه سودمند نمی باشد.

جدول ۲-۲ انرژی لازم جهت تولید مواد تشکیل دهند ساختمان میکروبی.

پلیمر سنتز شده	ترکیب در باکتری (گرم در ۱۰۰ گرم سلول)	ATP مورد نیاز (۱۰^۴ مول به ازای هر گرم سلول از مواد مختلف)		
		استات	پیروات	گلوکز
پروتئین	۵۲/۴	۴۲۷	۳۳۹/۴	۲۰۴/۹
DNA	۳/۲	۱۹	۲۹/۸	۲۴/۴
RNA	۱۵/۷	۱۰۱	۷۱/۲	۴۳/۷
چربی	۹/۴	۵۰	۲۷	۱/۴
پلی ساکاریدها	۱۶/۶	۹۲	۷۱/۸	۲۰/۶
کل ATP مورد نیاز	-	۶۸۹	۵۴۰	۲۹۵
کارایی انرژی (Y_{ATP})	-	۱۰	۱۳/۵	۲۸/۸

استوسمر، ۱۹۷۹.

از طرف دیگر هنگام تعیین میزان انرژی مورد نیاز جهت تولید پلیمرها، باید به نوع میکروارگانیسم ها، نرخ رشد ویژه و تعادل بین میکروب ها توجه خاصی نمود (جدول ۳-۲). به طور مثال میکروب هایی که دارای نرخ رشد ویژه کندتری هستند، کارآیی انرژی در آنها نسبت به سایر میکروارگانیسم ها که نرخ رشد ویژه در آنها بیشتر است، کمتر می باشد.

جدول ۳-۲ کارآیی انرژی در گونه های مختلف میکروارگانیسمی.

ردیف	نوع میکروارگانیسم	Y_{ATP}	مرجع
۱	*Streptococcus faecalis*	۱۰/۹	باوچاپ و السن ۱۹۶۰
۲	*Saccharomyces cerevisiae*	۱۰/۲	باوچاپ و السن ۱۹۶۰
۳	*Escherichia coli*	۹/۴۰	هرناندز و جانسون ۱۹۶۷
۴	*Sarcina ventriculi*	۱۱/۷	استفن سون و دیوس ۱۹۷۱
۵	*Bifidobacterium bifidum*	۱۳/۱	دو- ریس و استوسمر ۱۹۶۸
۶	*Ruminococcus flavefaciens*	۱۰/۶	هاپگود و والکر ۱۹۶۷
۷	*Ruminococcus albus*	۱۱/۵	هانگیت ۱۹۶۳
۸	*Selenomonas ruminantium*	۱۵/۵	هابسون و سامرز ۱۹۷۲
۹	*Anaerovibrio lipolytica*	۱۱/۰	هابسون ۱۹۶۵
۱۰	*Lactobacillus casei*	۲۰/۰	دو- ریس و همکاران ۱۹۷۰
۱۱	*Actinomyces naeslondii*	۱۸/۰	بوچانن و پین ۱۹۶۷
۱۲	*Bacteroides ruminicola*	۲۳/۰	هاولت و همکاران ۱۹۷۶
۱۳	*Bacteriodes fragilis*	۱۹/۶	مکی و همکاران ۱۹۷۵

یعنی همانطور که در جدول ۳-۲ نشان داده شده است، باکتری *Bacteroides ruminicola* **نسبت به باکتری** *Escherichia coli* به ازای هر مول مقدار بیشتری سلول میکروبی خشک شده تولید می نماید. اگر چه نرخ رشد ویژه میکروب ها تابع خصوصیات ژنتیکی می باشد، اما شرایط محیطی عامل بروز محسوب می شود.

اگر میکروارگانیسم به میزان انرژی مورد نیاز، نیتروژن قابل دسترس و وقت کافی دست پیدا نکنند، فقط در حد یک میکروارگانیسم باقی خواهد ماند و توده سلولی تشکیل نخواهد شد. لازم به ذکر است که کارآیی انرژی به عواملی مانند کمیت و کیفیت خوراک مصرفی (ماهیت ملکولهای غذایی)، تعادل مواد مغذی خوراک بخصوص نسبت انرژی به پروتئین و محیط شکمبه وابسته می باشد. نوع نیتروژن مصرفی براساس کیفیت خوراک می تواند در کارآیی انرژی موثر باشد. امروزه کارشناسان بر این باورند که ۵۰ درصد میکروارگانیسم های شکمبه نیاز به نیتروژن آمینی (نیتروژن موجود در اسیدهای آمینه و پپتیدها) جهت رشد دارند که فقدان آن سبب کاهش رشد و کارآیی انرژی در شکمبه می شود. بازدهی رشد این میکروب ها در مقایسه با آنهایی که از نیتروژن آمونیاکی استفاده می کنند، بمراتب بیشتر است. علت آنرا می توان در کاهش مصرف اسکلت کربنی مورد نیاز میکروب ها دانست. بخشی از انرژی قابل متابولیسمی خوراک که توسط میکروارگانیسم ها جهت حفظ و بقای خود مورد استفاده و تخمیر قرار می گیرد را انرژی قابل تخمیر (Fermentation Metabolizable Energy) می گویند. هر چه نسبت میزان انرژی قابل تخمیر به انرژی قابل متابولیسم بیشتر باشد میزان سنتز میکروبی بیشتر و انرژی قابل متابولیسم کمتری به دام می رسد. لذا همواره بین رشد میکروبی، مجموع مواد مغذی قابل هضم (Total Digestible Nutrient) و انرژی قابل تخمیر (FME) ارتباط وجود دارد. البته این ارتباط در بخش های ارزشیابی گاهی آشکار و گاهی مخفی می باشد. رشد و میزان سنتز میکروبی همواره به میزان انرژی آزاد شده و نیتروژن مورد دسترس وابسته می باشد. بطور مثال؛ ازدیاد انرژی به دلیل عدم دسترسی به نیتروژن مورد نیاز سبب هدر روی انرژی بصورت Energy splitting می شود و کارآیی انرژی پایین می آید. البته کمبود انرژی بواسط مصرف آن در دیواره سلولی میکروب ها جهت انتقال مواد مغذی هم سبب کاهش کارآیی انرژی می شود.

انرژی قابل تخمیر در مجموع شامل انرژی قابل متابولیسم، منهای انرژی قابل متابولیسم چربی و انرژی قابل متابولیسم اسیدهای چرب فرار تخمیری موجود در خوراک (مانند سیلوها) است. علت این کسر عدم استفاده این انرژی توسط میکروب ها در شکمبه می باشد. همچنین باید در نظر داشت که انرژی های حاصل از مواد غذایی عبوری مانند پروتئین های کپسولی عبوری را باید در این کسر شرکت

داد. برای افزایش کارآیی انرژی قابل تخمیر توسط میکروب ها لازم است پروتئین موثر قابل تجزیه در شکمبه (Efficiency Rumen Degradable Protein) نیز افزایش یابد.

آخرین روش جهت مشخص کردن کارآیی انرژی، قابلیت هضم مواد مغذی می باشد. هر ماده آلی قابل تخمیر که وارد شکمبه می شود تحت تاثیر تخمیر میکروبی تجزیه و مورد مصرف میکروارگانیسم ها قرار می گیرد. براساس همین فرضیه می توان گفت میزان کاهش مواد مغذی در شکمبه با رشد میکروبی مترادف بوده و با اندازه گیری قابلیت هضم مواد مغذی می توان به رشد توده میکروبی دست پیدا کرد.

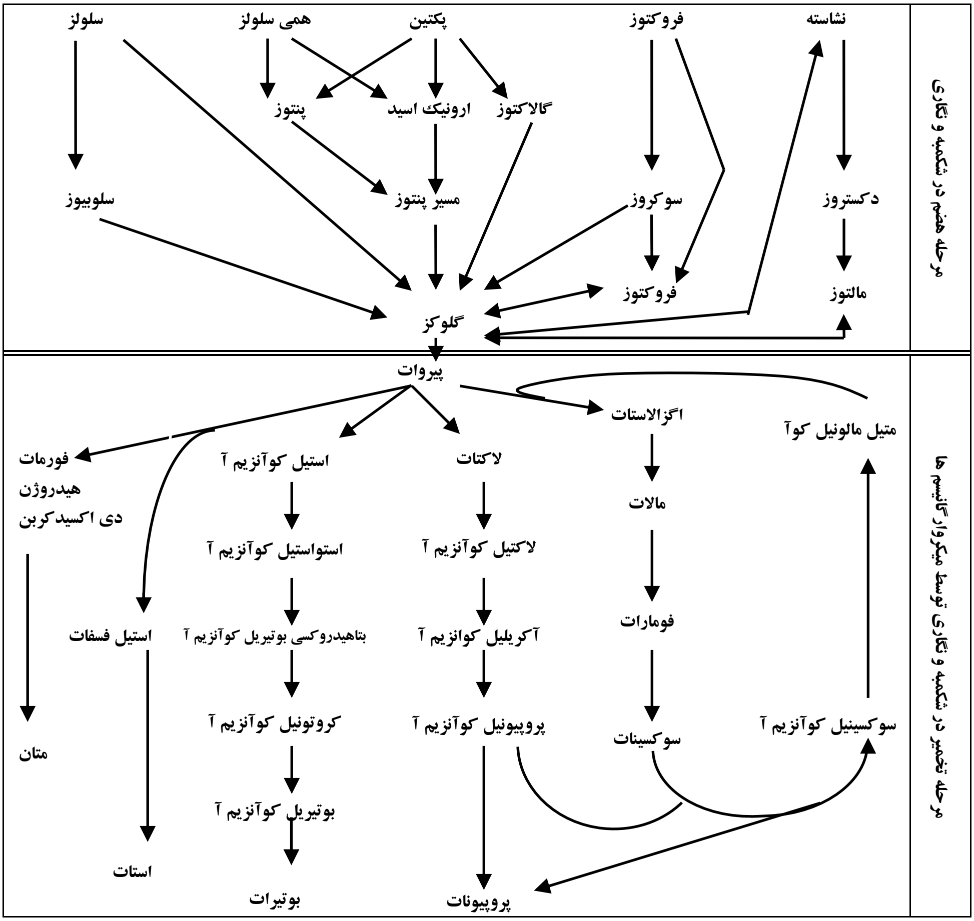
۲-۴-۲ کربوهیدرات

اهمیت کربوهیدرات ها آنقدر زیاد است که چشم پوشی درباره متابولیسم و کارآیی این ماده غذایی در جیره نشخوارکنندگان سبب ناکارآمدی نشخوارکنندگان، مصرف کنندگان اصلی کربوهیدرات های گیاهی خواهد شد. نیمی از انرژی مورد نیاز نشخوارکنندگان از کربوهیدرات های موجود در غذا تامین می شود. مهمترین منابع کربوهیدراتی موجود در خوراک نشخوارکنندگان فیبر (شامل سلولز و همی سلولز که ۴۰ درصد پلی ساکاریدها را تشکیل می دهند) و نشاسته موجود در غلات می باشد. متابولیسم کربوهیدرات ها توسط باکتری های شکمبه صورت گرفته و نهایت این متابولیسم منجر به ساخت اسیدهای چرب فرار (Volatile Fatty Acids)، متان و دی اکسیدکربن در شکمبه می شود (شکل ۴-۲). ازطرف دیگر، ۵ تا ۲۰ درصد کربوهیدرات ها به روده وارد و مورد هضم و متابولیسم قرار می گیرند. لذا، به دلایل فوق، تنظیم متابولیسم کربوهیدرات ها در نشخوارکنندگان اهمیت بالایی دارد.

برای بررسی متابولیسم صحیح کربوهیدرات ها که به دو بخش هیدرولیز پلیمری خارج سلولی و تخمیر داخل سلولی تقسیم می شوند، لازم است شناخت کافی از طبقه بندی غذایی آنها ارائه شود. کربوهیدرات ها را بطور کلی به سه گروه (۱) مونوساکاریدها شامل آلدوپنتوزها (دی و ال - آرابینوز و دی- زایلوزها)، آلدوهگزوزها (دی- گلوکز، دی- مانوز و دی- گالاکتوز) و کتوهگزوزها (دی- فروکتوز) می باشد؛ (۲) اولیگوساکاریدها که شامل دی ساکارید (سوکروز، مالتوز و لاکتوز)، تری ساکارید (رافینوز) و تترا ساکارید (استایوز) بوده و (۳) پلی ساکاریدها که ساختاری (سلولز، همی سلولز، پکتین و شبه قند لیگنین) و غیر ساختاری (نشاسته و گلیکوژن) طبقه بندی می شوند، تقسیم نمود.

بیشترین کربوهیدرات های مصرف شده توسط نشخوارکنندگان نشاسته و سلولز می باشد که از باندهای گلوکز ساخته شده اند. اما کربوهیدرات های همی سلولز و پکتین هم در خوراک نشخوارکنندگان به وفور یافت می شوند. خوراک های فرآوری شده مانند ملاس هم دارای مونو و دی

ساکارید می باشند. اما این مواد درصد کمتری از ترکیبات جیره را شامل می گردند. با ورود هر یک از کربوهیدرات های اشاره شده در شکمبه و وجود سایر مواد مغذی، میکروارگانیسم ها شروع به ترشح آنزیم های خاص خود نموده و تجزیه کربوهیدرات ها آغاز می شود. کربوهیدرات ها به کوچکترین واحدهای سازنده خود مانند گلوکز، مالتوز و فروکتوز تجزیه می شوند و پس از جذب در سلول میکروارگانیسم ها یا دیواره های روده نشخوارکنندگان دوباره به سایر مواد کربوهیدراتی تخمیر و تبدیل می شوند.



شکل ٤-٢: متابولیسم کربوهیدرات ها در شکمبه.

پس از تجزیه کربوهیدرات ها به واحدهای گلوکز، محصول نهایی در مسیر امبدن میرهوف (Embden Meyerhof) به آدنوزین تری فسفات (ATP) و پیروات تبدیل می گردد. پیروات واسطه تبدیل کربوهیدرات ها به اسیدهای چرب فرار، هیدروژن، متان و دی اکسیدکربن در باکتری ها می

باشد. اسیدهای چرب فرار تولید شده می توانند پس از جذب از طریق مسیر نئوگلوکوژنز، دوباره گلوکز مورد نیاز دام را فراهم نمایند. ۹۰ درصد گلوکزهای مورد نیاز دام های نشخوارکننده از طریق همین روند و از پروپیونات تولید می شوند. میزان گلوکز خون دام های بالغ همواره از گوساله های شیرخوار کمتر بوده است که علت این مسئله را می توان در نوع مکانیسم هضم و مصرف مواد مغذی مورد نیاز گوساله دانست. لازم به ذکر است که گلوکز مورد نیاز گوساله ها بر عکس دام های بالغ از اسیدهای چرب فرار تامین نمی گردد و از تجزیه مواد قندی و نشاسته، توسط آنزیم های گوارشی گوساله حاصل می شود. علت اصلی این فرآیند عدم تخمیر میکروبی در گوساله های شیرخوار به دلیل فقدان شکمبه توسعه یافته می باشد. اما با افزایش سن گوساله، روند متابولیسم کربوهیدرات از حالت تک معده ای در گوساله ها (تجزیه قند و جذب گلوکز) به معده چند قسمتی در نشخوارکنندگان (تولید اسیدهای چرب فرار) تغییر می یابد. نهایت تجزیه و تخمیر کربوهیدرات ها در شکمبه اسیدهای چرب فرار متنوعی است که ۷۰ تا ۸۰ درصد انرژی دام را فراهم می نمایند.

بیشترین مقدار اسیدهای چرب فرار به ترتیب مربوط به اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک بوده و سایر اسیدهای چرب فرار مانند والرات (از ترکیب اسید استیک و پروپیونیک حاصل می شود)، ایزوبوتیریک، کاپروئیک (تشکیل شده از سه اسید استیک)، ۲-متیل بوتیریک و ایزووالریک مقدار اندکی را شامل می گردند. نوع اسید چرب فرار تولید شده به نوع کربوهیدرات مصرفی، گونه باکتریایی فعال شده، محیط شکمبه، نوع خوراک مصرفی (نسبت بین علوفه به مواد متراکم (جدول ۴-۲)) و مدت زمان حضور مواد غذایی در شکمبه بستگی دارد. تقریبا ۷۰-۵۰ درصد اسیدهای چرب مربوط به اسید استیک، ۳۰-۱۶ مربوط به اسید پروپیونیک و ۱۰-۷ درصد هم مربوط به اسید بوتیریک می باشد. سایر اسیدهای چرب محدود و کمتر از ۵ درصد از کل اسیدهای چرب فرار می باشد.

جدول ۴-۲ اثر نوع کربوهیدرات جیره بر غلظت اسیدهای چرب.

ردیف	نسبت علوفه به مواد متراکم	واحد به مولار		
		استات	پروپیونات	بوتیرات
۱	۱۰۰ به صفر	۷۱/۴	۱۶/۰	۰۷/۹
۲	۷۵ به ۲۵	۶۸/۲	۱۸/۱	۰۸/۰
۳	۵۰ به ۵۰	۶۵/۳	۱۸/۴	۱۰/۴
۴	۴۰ به ۶۰	۵۹/۸	۲۵/۹	۱۰/۲
۵	۲۰ به ۸۰	۵۳/۶	۳۰/۶	۱۰/۷

آدامز، ۱۹۶۳.

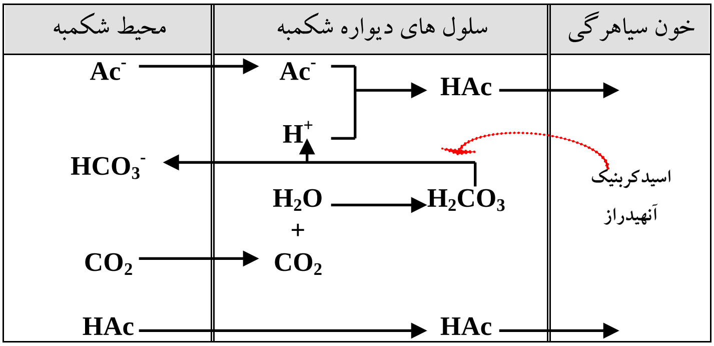
گونه باکتری می تواند سبب بروز مکانیسم های متفاوت و گاه همزمان در تشکیل پیروات به اسید استیک گردد. مثلا مسیر پیروات-فومارات که اولین و مهمترین مکانیسمی است که توسط یک گونه باکتریایی خاص آغاز و ماده واسط آن فومارات و استیل کوآنزیم آ است، می تواند به مسیر پیروات-فرردوکسین که توسط گونه ای دیگر از باکتری ها آغاز و ماده واسط آن استیل کوآنزیم آ و دی اکسیدکربن می باشد، تغییر نماید. و یا جهت تولید اسید پروپیونیک دو مسیر متفاوت اسید دی کربوکسیلیک و آکریلات توسط دو گونه مختلف از باکتری ها فعال می گردد.

از طرف دیگر، تاثیر خوراک مصرفی هم می تواند اثر بسزایی در متابولیسم کربوهیدرات ها داشته باشد. مثلا نشاسته فراوان و یا سهل الهضم می تواند مسیر ساخت اسیدهای چرب فرار را از مسیر پیروات-لاکتات هدایت نموده و غلظت اسیدهای چرب تولیدی را دچار تغییر نماید. اما در نهایت آنزیم ها هستند که مسئولیت هضم و تخمیر مواد غذایی و اسیدهای چرب را دارند. این آنزیم ها توسط باکتری ها و یا دام تولید می شوند. نمونه مشهور این دسته از آنزیم ها که توسط باکتری ها تولید می شوند، آمیلولایتیک و سلولایتیک می باشد.

چهار گونه باکتری به نامهای **سوکسینوموناس آمیلولایتیکا** (*Succinimonas amylolytica*)، باکتروئیدس آمیلوفیلوس (*Bacteroides amylophilus*)، استرپتوکوکوس بوویس (*Streptococcus bovis*) و سوکسینوویبریو دکسترینوزول (*Succinivibrio dextrinosol*) هستند که بیشترین فعالیت های آمیلولایتیک و دکسترینولایتیک را انجام می دهند. به همین دلیل با ورود نشاسته و مواد مشابه آن ابتدا این باکتری ها فعال و نشاسته را به مالتوز و گلوکز هیدرولیز می کنند. سپس مالتوز تولید شده توسط میکروب های ساکارولایتیک مانند باکتروئیدس رومینوکولا (*Bacteroides ruminicola*)، بوتیری ویبریو فیبروسولونس (*Butyrivibrio fibrisolvens*) و سلنوموناس رومینانتیوم (*Selenomonas ruminantium*) تخمیر می شوند.

اسیدهای چرب فرار تولید شده در شکمبه تحت تاثیر مکانیسم های بعدی مانند انتشار از شکمبه، نگاری و هزارلا جذب و مورد مصرف نشخوارکنندگان قرار می گیرد (شکل ۵-۲). ۷۵ تا ۸۵ درصد اسیدهای چرب فرار در نگاری- شکمبه جذب و ۱۰ تا ۱۹ درصد آن در هزارلا و شیردان و ۵ درصد آن در روده ها جذب می شود. سرعت و میزان جذب اسیدهای چرب فرار به اسیدیته محیط شکمبه، نرخ گردش خون و غلظت و نسبت اسیدهای چرب فرار بستگی دارد. بطور مثال؛ افزایش پروپیونات و بوتیرات و کاهش نسبت استات به پروپیونات سبب ازدیاد زائده های انگشتی شکمبه شده و میزان جذب پروپیونات را افزایش می دهد، این در حالی است که استات سبب بزرگتر یا طویل تر شدن زائده های

انگشتی شکمبه می گردد، تا بتواند با نفوذ در بین علوفه هضم و تخمیر شده اسید استیک مورد نیاز خود را جذب نماید. اما در نهایت بیشترین سرعت جذب اسیدهای چرب فرار بین شکمبه و سلول های دیواره شکمبه به ترتیب مربوط به اسید بوتیریک، پروپیونیک و استیک می باشد. در حالی که سرعت جذب بین دیواره سلولی شکمبه و مویرگ خونی برعکس حالت فوق می باشد. اما در صورت افزایش بی رویه اسیدهای چرب فرار در محیط شکمبه (بیش از ۲۰۰ میلی مول در لیتر) میزان جذب را قطع و حتی فعالیت میکروارگانیسمی را مختل می نماید. بهترین دامنه غلظت اعلام شده از سوی محققین بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی مول در لیتر است.



شکل ۵-۲ چگونگی جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه.

اسید استیک، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک در اسیدیته ۶ تا ۷ به حالت یونی بوده (به دلیل قدرت تفکیک اسیدهای چرب فرار(pK_a)) و براحتی جذب می شوند. اما دیده می شود نیمی از اسید بوتیریک پس از تبدیل شدن به بتا هیدروکسی بوتیرات و ۵ درصد اسید پروپیونیک پس از تبدیل شدن به اسید لاکتیک وارد خون و وارد مسیر متابولیسم بدنی می شوند.

۳-۴-۲ پروتئین

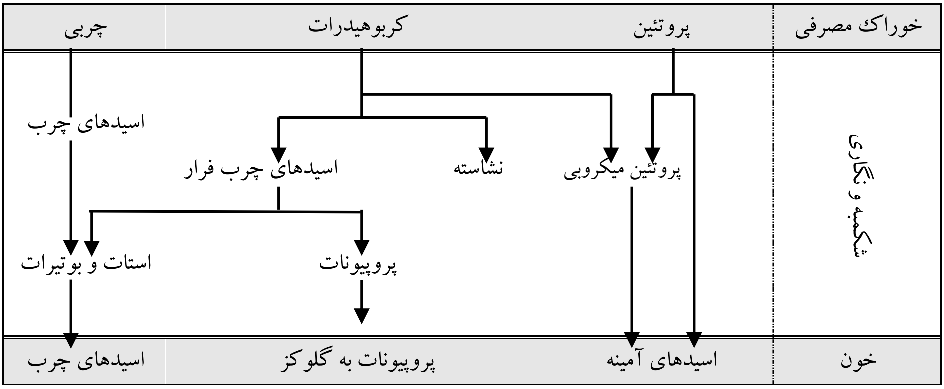
متابولیسم پروتئین در شکمبه ناشی از فعالیت میکروارگانیسم ها (بیشتر باکتری ها و پروتوزوآها) در شکمبه بوده و ساختار پروتئین کلید اصلی متابولیسم پروتئین ها در شکمبه می باشد. پروتئین ها از دسته موادی هستند که به شدت تحت تاثیر تخمیرهای میکروبی شکمبه قرار گرفته و به پروتئین های میکروبی تبدیل می شوند. پروتئین ها براساس ساختار تشکیلاتی، به دو بخش عمده، پروتئین های حقیقی (True Protein) و ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی(Non Protein Nitrogen) مانند اوره طبقه بندی می شوند. پدیده کلیدی استفاده از ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی مبتنی بر ظرفیت استفاده از جمعیت میکروبی در حضور انرژی کافی می باشد. بیشتر از ۸۰ درصد باکتری های شکمبه قادرند از ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی استفاده نمایند، که ۲۵ درصد از آن مطلقا از ترکیبات غیر پروتئینی استفاده می

کنند. اما طبقه بندی دیگری براساس تجزیه پروتئین در شکمبه وجود دارد که به دو بخش پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (Rumen Degradable Protein) که خود به دو بخش سریع تجزیه که بیشترین اثر پروتئولایتیک بر روی این طبقه انجام می گیرد و پروتئین با تجزیه آهسته تقسیم می شود، و پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه (Rumen Undegradable Protein) که پروتئولایتیک اثر چندانی بر روی آنها ندارد، طبقه بندی می شوند. البته پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه گاهی در سایر بخش ها هضم و جذب می شوند. بر همین اساس نقل و انتقال نیتروژن در شکمبه در درجه اول تابع نوع پروتئین مصرفی (میزان محلولیت و مقدار نیتروژن آزاد آن) و میزان فرآوری آن (فرآوری پروتئین ها با اشکال مختلف شیمیایی و فیزیکی مانند ژلاتینی کردن یا پختن انجام می گیرد) در خوراک می باشد. حلالیت پروتئین مصرفی کلید اصلی تجزیه پذیری توسط پروتئازهای میکروبی می باشد. برای مثال پرولامین ها و گلوتلین ها نامحلول بوده و تجزیه پذیری کمی دارند. این در حالی است که گلوبولین ها محلولیت بالایی داشته و بیشترین تجزیه پذیری را در شکمبه دارا می باشند. اما عواملی مانند حرارت یا ژلاتینی کردن می تواند نوع تجزیه پذیری را براساس تغییرات در باندهای پروتئینی بوسیله سولفاته کردن در انتهای زنجیره پپتیدی، کم کند. ایجاد باندهای دی سولفیدی در قسمت سوم ساختمان پروتئین ها و خمیده یا تا کردن ساختار پروتئینی می تواند سبب عبوری شدن یک پروتئین و دوری از تخریب و بازسازی پروتئین ها توسط میکروب ها شود. بطور مثال؛ تشکیل اسید گلیسینین از دی سولفید کردن گلیسینین و یا تشکیل لوسین در انتهای پپتیدهای موجود در کنجاله سویا توسط حرارت سبب مقاومت شدید اسیدهای آمینه فوق در برابر تخمیر میکروبی می شود. همچنین باندهای تشکیل شده از اسیدهای آمینه می تواند در تجزیه پذیری اثر بسزایی داشته باشند. بطور مثال؛ ترکیبات لیزین- پرولین و پرولین- متیونین دیرتر از ترکیبات لیزین- آلانین و آلانین- متیونین، هضم و تجزیه می شوند. همچنین نوع اسیدآمینه در تجزیه پذیری پروتئین موثر می باشد. تحقیقات نشان می دهد که بیش از ۶۶ درصد از پپتیدهایی که حاوی اسیدآمینه های آروماتیک حلقوی مثل پرولین هستند قدرت تجزیه پذیری کمی در شکمبه دارند. بعد از نوع خوراک مصرفی، اسیدیته شکمبه، تنوع میکروبی، مدت زمان ماندگاری غذا در شکمبه، توانایی شکمبه در جذب نیتروژن و اثرات متقابل مواد مغذی دیگر مانند قندها، نقش حیاتی در متابولیسم پروتئین ها بازی می کنند.

مدت زمان حضور پروتئین در شکمبه براساس میزان ماندگاری غذا می تواند به دلیل تماس بیشتر باکتری ها و پروتوزوآ ها با پروتئین ها، تجزیه پذیری را افزایش دهد. عوامل موثر در مدت زمان ماندگاری غذا در شکمبه عبارتنداز: میزان رطوبت ماده مصرفی، میزان خوراک مصرفی، مقدار فیبر خوراک و نسبت علوفه به مواد متراکم جیره می باشد. همچنین pH مطلوب برای متابولیسم پروتئین ها و

مخصوصا آنزیم های پروتئاز بین ۵/۵ تا ۷ می باشد، و پایین تر از ۵/۵ سبب کاهش فعالیت های آنزیم پروتئازی و کاهش آمونیاک شکمبه و دیکته شدن فعالیت نوع جدیدی از میکروارگانیسم ها می گردد. البته لازم به ذکر است که نوع خوراک مصرفی می تواند براساس نوع تخمیر خاص خود، فعالیت آنزیمی میکروب ها را در مقابل اسیدیته شکمبه تحت تاثیر قرار داده و اثرات اسیدیته را بر آنزیم کاهش دهد.

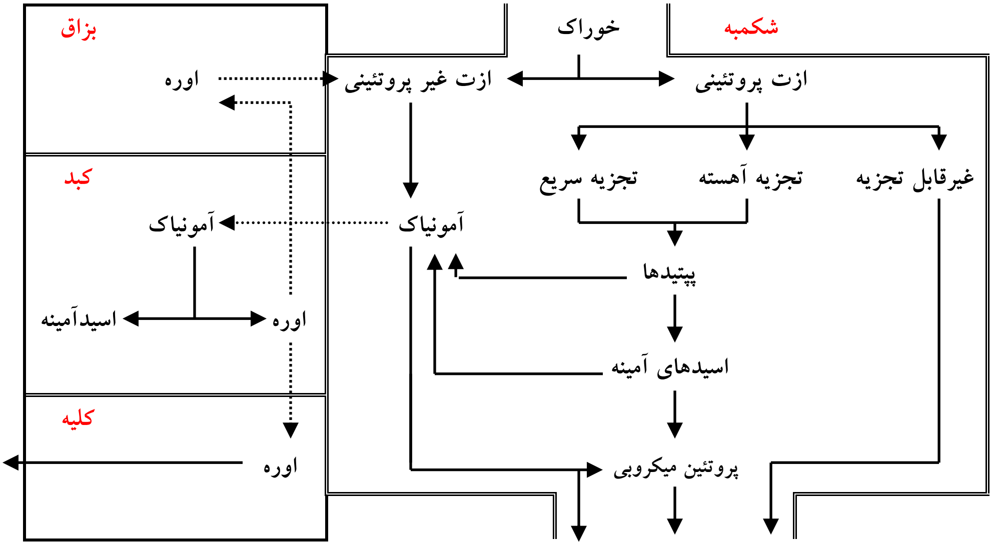
از طرف دیگر، اثرات متقابل مواد غذایی هم بر متابولیسم پروتئین نقش اساسی بازی می کند (شکل۶-۲). بطور مثال، مدارکی موجود است که نشان می دهد اثر نشاسته بر روند تجزیه پذیری پروتئین ها بسیار مهم و در صورت نامتوازن بودن مقدار آن با پروتئین سبب اختلال در روند متابولیسم پروتئین در شکمبه می شود. یعنی افزایش آنزیم آمیلاز در خوراک های مصرفی شامل غلات، سبب افزایش تجزیه پذیری پروتئین به میزان ۶ تا ۲۰ درصد می گردد که نشان از رابطه مستقیم تجزیه پذیری نشاسته با پروتئین است. همچنین، افزایش آنزیم سلولاز به محیط شکمبه سبب افزایش تجزیه پذیری پروتئین از ۴۲ درصد به ۵۳ درصد شده است. این نشان می دهد که علاوه بر انرژی تامین شده میکروب ها از این طریق، تعدادی از پروتئین های غذایی در لایه های غذایی مانند فیبر، سلولز و غیره به دام افتاده اند که با افزودن آنزیم های مربوطه، تجزیه پذیری آنها بیشتر می گردد. البته حضور سایر مواد غذایی همراه با آنزیم های آنها سبب مطلوب تر شدن اسیدیته شکمبه (از طریق متابولیسم کربوهیدرات ها، چربی ها و کنترل اسیدهای چرب فرار تولیدی) جهت تجزیه و ساخت پروتئین می شود. نهایتا برای برقراری متابولیسم پروتئین در شکمبه علاوه بر آنزیم های پروتئاز و شرایط مطلوب آن به سایر روندهای متابولیسمی و آنزیم های غذایی مربوط به آنها نیاز می باشد.



شکل ٦-٢ اثرات متقابل مواد غذایی در متابولیسم شکمبه.

تراکم اسیدهای آمینه و انرژی در شکمبه می تواند میزان تجزیه پذیری پروتئین را محدود و متابولیسم آن را در شکمبه تحت شعاع قرار دهد. تراکم سه اسید آمینه به نام های فنیل آلانین، لوسین و ایزولوسین بیشترین اثر را در این زمینه ایجاد می کنند. همچنین کمبود و یا بیش بود انرژی قابل دسترس اثر بسزایی در تخمیر میکروبی و در کل متابولیسم پروتئین خواهد داشت. انرژی محدود کننده بسیار مهمی در تبدیل اسیدآمینه ها و آمونیاک به پروتئین میکروبی می باشد. در صورت کمبود انرژی اسیدهای آمینه جهت تولید اسیدهای چرب فرار مصرف می شوند.

نهایتا مسیر نهایی متابولیسم پروتئین ها در شکمبه آمینواسیدهای میکروبی، نیتروژن اضافی جذب شده، اسیدهای آمینه دست نخورده و پروتئین های عبوری می باشند (شکل ۷-۲). میزان و نوع پروتئین عبوری به مدت زمان حضور مواد غذایی در شکمبه، تنوع باکتریایی و ترکیب پروتئین مصرفی دارد. اما به طور کلی ۳۵ تا ۴۰ درصد پروتئین مصرفی به صورت دست نخورده از شکمبه خارج شده (پروتئین عبوری) و ۶۰ تا ۶۵ درصد آن به شکل های مختلف تجزیه و در روند متابولیسم تغییر و به آمونیاک، پپتیدها و اسیدهای آمینه تبدیل و نهایتا به پروتئین میکروبی تبدیل می شوند. همانطور که از شکل ۷-۲ مشخص است روند تجزیه پروتئین در شکمبه دو مرحله دارد: مرحله اول، هیدرولیز پروتئین ها به پپتیدها و اسیدهای آمینه و مرحله دوم، آمین زدایی و تجزیه اسیدهای آمینه می باشد.



شکل ۷-۲ متابولیسم پروتئین در شکمبه.

نرخ هیدرولیز در مرحله اول، تابع نرخ آمین زدایی در مرحله دوم می باشد. هر چه قدر میزان آمین زدایی کمتر باشد، به دلیل انباشتگی اسیدهای آمینه در شکمبه نرخ هیدرولیز پروتئین کاهش می یابد.

سرعت آمین زدایی وابسته به نوع اسید آمینه می باشد. سرعت تجزیه شدن آنها به ترتیب ذیل انجام می گیرد:

لوسین< والین< آرژنین< هیستیدین< ایزولوسین< لیزین

کیفیت و متابولیسم پروتئین میکروبی در شکمبه وابسته به میزان انرژی قابل دسترس، تنوع میکروارگانیسم های در حال فعالیت، نوع پروتئین و اسیدهای آمینه قابل مصرف می باشد. همچنین، میزان متابولیسم پروتئین در شکمبه به میزان آمونیاک تولید شده در شکمبه ارتباط مستقیم دارد. اما هر چه میزان غلظت آمونیاک در شکمبه بالاتر رود، فرآیند تجزیه پروتئین کندتر و یا متوقف می گردد. البته در این روند غلظت اسیدهای چرب مانند اسید لاکتیک و بوتیرات به صورت تاثیر بر اسیدیته محیط شکمبه، مهم و حیاتی می باشند. بصورتیکه در اسیدیته خنثی (pH = ۷) بیش از ۹۵ درصد آمونیاک به شکل یون آمونیوم درآمده که دیواره شکمبه قدرت کمتری در جذب آن دارد. افزایش آمونیاک تولیدی در شکمبه سبب جذب آن توسط دیواره شکمبه به صورت انتشار شده و سبب خروج موقت آمونیاک از چرخه متابولیسم پروتئین در روند تخمیر می شود. آمونیاک اضافی موجود در خون به بزاق و کبد رفته و دوباره وارد سیکل مصرفی می شود. تقریبا بین ۲۰ تا ۹۰ درصد اوره موجود در خون نشخوارکنندگان براساس میزان آمونیاک تولید شده در شکمبه وارد روند تخمیری می گردد. آمونیاک اضافی از طریق کلیه دفع می شود. اما جذب آمونیاک توسط باکتری ها برای سنتز پروتئین به صورت فعال و گاهی اوقات غیر فعال انجام می گیرد.

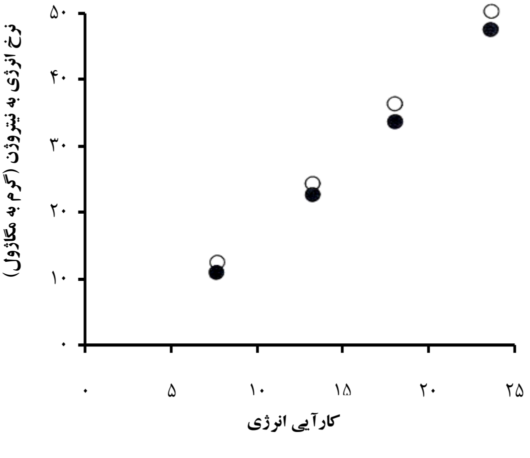
افزایش آمونیاک در شکمبه بدون انرژی مورد نیاز جهت سنتز پروتئین میکروبی کارآیی لازم را نخواهد داشت. افزایش آمونیاک سبب عدم تعادل فلور میکروبی شکمبه و کاهش هضم شده و نهایتا کاهش پروتئین میکروبی را شامل می شود. بهترین غلظت اعلام شده آمونیاک در شکمبه ۱۸ میلی گرم در هر ۱۰۰ سی سی مایع شکمبه می باشد. غلظت بیش از ۵۰ میلی گرم در هر لیتر مایع شکمبه موجب کاهش فعالیت های میکروبی می شود. البته در عین حال این غلظت بین ۳۰ تا ۲۵۰ میلی گرم در هر لیتر مایع شکمبه در نوسان است. علت این نوسان و عدم مسمومیت می تواند ناشی از انرژی قابل دسترس در شکمبه باشد. جیره حاوی ۱۴ درصد پروتئین خام غلظت آمونیاک را به ۵۰ میلی گرم در هر لیتر مایع شکمبه می رساند.

۱-۳-۴-۲ نسبت انرژی به پروتئین و آزادسازی همزمان آنها

یکی از راه های ساده انتقال انرژی که شاخص کارآیی انرژی (Y_{ATP}) در شکمبه محسوب می شود، کنترل تعادل نیتروژن به انرژی و تثبیت آن در میکروب ها می باشد. هر چه میزان تعادل دقیق تر گردد، کارآیی انرژی نیز افزایش یافته و روند تخمیر جهت انتقال انرژی بهینه تر خواهد شد (شکل ۸-

۲). اکثر تحقیقات نشان داده است که ایجاد تعادل در ورود انرژی و نیتروژن در شکمبه میزان فعالیت های میکروبی اعم از رشد و تجدید نسل را بهبود بخشیده و سبب قرار گرفتن نیتروژن در مسیر پروتئین سازی شکمبه می شود. این تعادل باعث بهبود تولیدات میکروبی مانند اسیدهای چرب فرار و افزایش فعالیت های هضمی مانند هضم سلولز می شود.

میزان پروتئین مصرفی یا ورود نیتروژن به شکمبه به مقدار انرژی قابل دسترس و نحوه آزادسازی هر دوی آنها وابسته است. اگر چه این فرضیه بصورت محدود ثابت شده است اما باید در نظر داشت که آزادسازی همزمان انرژی و نیتروژن در تعادل مربوطه اثر مثبت می گذارد. هر چند تاثیر آزادسازی همزمان این دو ماده مغذی به دلیل تجربیات کمتر هنوز به شکل مستند و قابل قبول ارائه نشده است. می توان گفت آزادسازی همزمان انرژی و پروتئین در شکمبه سبب افزایش تجزیه پذیری پروتئین قابل هضم در شکمبه (RDP) شده و از فرار آن به روده جلوگیری می کند.



شکل ۸-۲ ارتباط بین کارآیی انرژی و نرخ انرژی به نیتروژن تولید شده در شکمبه.

از طرف دیگر مشخص شده است که عدم همزمانی در آزادسازی انرژی و نیتروژن می تواند تعادل ایجاد شده بین آنها را به دلیل بروز بعضی از بیماری های متابولیکی مانند اسیدوز و مسمومیت آمونیاکی ناشی از افزایش آمونیاک تولید شده در شکمبه و فقدان انرژی مطلوب و به موقع جهت استفاده میکروب ها از آن مختل نماید. به همین دلیل سرعت تجزیه شدن مواد مغذی مورد نیاز در شکمبه شرط اصلی در ایجاد تعادل بین انرژی و نیتروژن محسوب می شود که بایستی در دستکاری شکمبه مورد توجه قرار گیرد. بطور مثال؛ باید استفاده از مواد سریع الهضم انرژی زا مانند جو در کنار مواد دیر هضم پروتئینی مانند پودر ماهی جلوگیری نمود.

برای افزایش کارآیی انرژی قابل تخمیر (FME) توسط میکروارگانیسم ها لازم است پروتئین موثر قابل تجزیه در شکمبه (ERDP) نیز افزایش یابد و نسبت ۱ به ۱۰ در آن رعایت گردد. یعنی به عبارتی برای هر واحد انرژی قابل تخمیر (یک مگا ژول انرژی) ما ۱۰ گرم پروتئین قابل تجزیه در شکمبه نیاز داریم تا ۱۰ گرم پروتئین میکروبی (Microbial Crude Protein) از شکمبه دریافت نماییم. البته در صورتی که مقدار ERDP برابر MCP شود و آزادسازی انرژی و پروتئین، همزمان و با تعادل ویژه صورت گیرد. اولین فاکتور مورد نیاز جهت بررسی تعادل نیتروژن و انرژی مورد نیاز در خوراک مصرفی تعیین پروتئین قابل تجزیه موثر در شکمبه (ERDP) می باشد که براساس معادله ۴-۲ و ۵-۲ بیان می گردد:

معادله ۴-۲: ERDP (گرم در روز) = پروتئین خام * (۰/۸ a + bc / (c + r))

معادله ۵-۲: ERDP (گرم در روز) = FME (مگاژول در روز) * y

در این معادله؛ a = میزان نیتروژن محلول، b = میزان نیتروژن با تجزیه آهسته، c = نرخ تجزیه پذیری و r = سرعت جریان خروجی می باشد. برای هر یک از اقلام خوراک مصرفی می توان معیارهای a، b و c را به روش نایلون بگ گذاری در شکمبه بررسی و بدست آورد. جهت تعیین سرعت جریان خروجی می توان از معادله ۶-۲ استفاده کرد:

معادله ۶-۲: $r = ۰/۰۲ + ۰/۱۴ (۱ - e^{-۰/۳۵ L})$

همچنین، y را می تواند از معادله ۷-۲ محاسبه نمود:

معادله ۷-۲: $y = ۷ + ۶ (۱ - e^{-۰/۳۵ L})$

در معادله های ۶-۲ و ۷-۲ مقدار سطح خوراک دهی نسبت به نگهداری را L می نامند. رابطه بین پروتئین میکروبی تولید شده (MCP) و سطح مصرف خوراک یک رابطه مثبت توانی یا نمایی (Exponential) می باشد. یعنی هر چه میزان سطح خوراک بیشتر باشد، میزان MCP زیادتر می شود، ولی این افزایش دو برابر شدن نیست (جدول ۵-۲). با مصرف بیشتر خوراک، نرخ عبور مواد از شکمبه و ترن آور مواد مغذی زیادتر می شود و در نتیجه انرژی بیشتری نصیب میکروارگانیسم ها می شود.

جدول ۵-۲ اثر سطح تغذیه بر مقدار پروتئین میکروبی تولید شده.

سطح تغذیه نسبت به حالت نگهداری	۱	۱/۵	۲	۲/۵	۳	۳/۵
مقدار پروتئین میکروبی (گرم به ازای هر مگاژول FME)	۸/۸	۹/۵	۱۰/۰	۱۰/۵	۱۰/۹	۱۱/۲
نرخ سرعت جریان مواد از شکمبه (r/h)	۰/۰۱۹	۰/۰۳۷	۰/۰۵۲	۰/۰۶۶	۰/۰۷۷	۰/۰۸۷

فاکتور بعدی تعیین میزان انرژی قابل تخمیر در شکمبه (FME) می باشد که در مباحث پیشین بصورت انرژی قابل متابولیسم، منهای انرژی قابل متابولیسم چربی و انرژی قابل متابولیسم اسیدهای چرب فرار تخمیری موجود در خوراک (مانند سیلوها) اشاره شده است. معادله ۱۲-۲ چگونگی تعیین مقدار FME را نشان می دهد:

معادله ۸-۲:
$$FME = ME - ME_{Fat} - ME_{Fermentation}$$

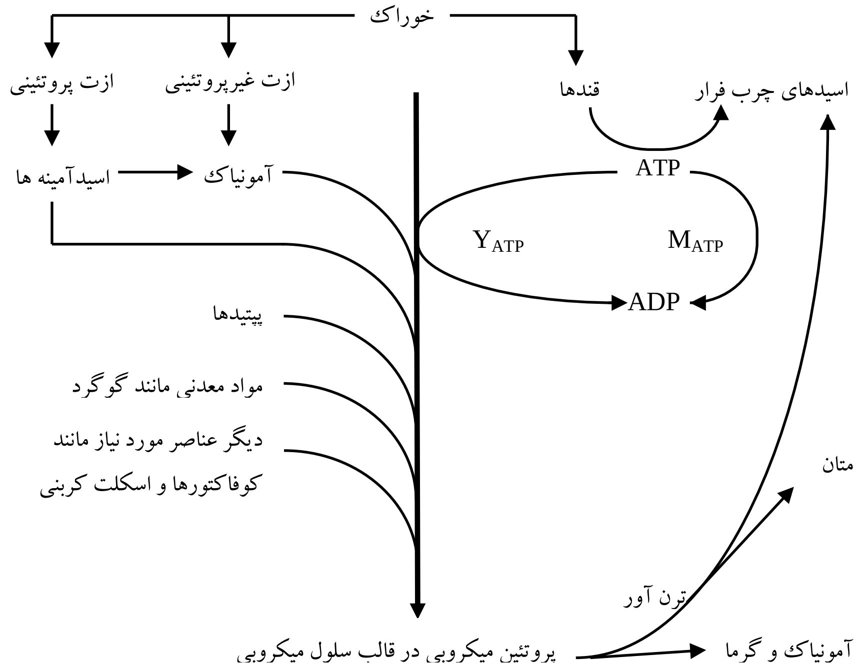
حال براساس تقسیم پروتئین قابل تجزیه موثر در شکمبه بر انرژی قابل تخمیر در شکمبه می توان به تعادل نیتروژن و انرژی خوراک مصرفی پی برد. در صورت افزایش رقم تقسیم به بیش از ۱۰ می توان به محدود بودن انرژی و کمتر از ۱۰ به محدود بودن نیتروژن خوراک اشاره کرد. لذا بیش بود یا کم بود هر یک از عوامل فوق (ERDP , FME) سبب عدم کارآیی و گاه سبب توقف چرخه انرژی و پروتئین سازی در شکمبه می شود. در صورت وجود تعادل در بین عناصر غذایی بخصوص انرژی و نیتروژن موجود در شکمبه و کنترل آزادسازی همزمان آنها می توان بیشترین برداشت پروتئین میکروبی را حتی به مقدار سه کیلوگرم در روز انتظار داشت. و در صورت وجود تعادل و همزمان سازی تجزیه انرژی و نیتروژن در شکمبه می توان از خروج سریع میکروب های شکمبه جلوگیری نموده و نرخ تجزیه پذیری و کارآیی سنتز پروتئین میکروبی (EMCP) را افزایش داد.

کارآیی سنتز پروتئین میکروبی مقدار پروتئین میکروبی تولید شده از هر کیلوگرم ماده آلی قابل هضم که وارد دوازده می شود، تعریف می گردد. لذا براساس تعریف فوق محققین کارآیی سنتز پروتئین میکروبی را تنها به تعادل انرژی و پروتئین مصرفی و یا همزمانی در آزادسازی آنها در شکمبه وابسته نمی دانند. بلکه سطح مصرف و کیفیت خوراک مصرفی را در این روند موثر می دانند. به طوریکه در جیره هایی که مواد مغذی بویژه انرژی و پروتئین سریع الهضم تری وجود داشته باشد، مانند خوراک ناشی از جو و اوره، کارآیی سنتز پروتئین میکروبی ۱۰ تا ۱۲ درصد بیشتر از خوراک حاوی ذرت و پودرماهی است که مواد غذایی آن آهسته تر هضم یا تجزیه می شوند. و یا استفاده از کربوهیدرات های غیرساختمانی مانند نشاسته در کنار پروتئین های حقیقی (اسیدهای آمینه و پپتیدها) و بکارگیری کربوهیدرات های ساختمانی مانند سلولز در کنار آمونیاک سبب افزایش پروتئین میکروبی و کارآیی انرژی به پروتئین می شود. همچنین، مصرف انرژی بیش از حد نگهداری که با سطح مصرف بیشتر خوراک همراه است سبب افزایش کارآیی سنتز پروتئین میکروبی می شود. این در حالی است که مصرف انرژی در حد نگهداری سبب افزایش نرخ عبور پروتئین میکروبی و کارآیی سنتز پروتئین میکروبی می گردد. از طرف دیگر، افزایش نیتروژن بیش از حد نگهداری فقط نرخ عبور پروتئین را

افزایش می دهد و بر کارآیی سنتز پروتئین میکروبی اثری ندارد. به همین دلیل است که آزادسازی همزمان انرژی و نیتروژن و یا تعادل آن نمی تواند به تنهایی شاخص خوبی برای تعیین میزان تولیدات میکروبی و سنتز پروتئین میکروبی در دستکاری های شکمبه باشد.

۲-۳-۴-۲ سنتز پروتئین میکروبی

سهم پروتئین میکروبی که در سطح روده کوچک جذب می گردد، بیش از ۷۰ درصد از پروتئین خوراکی مصرف شده است. از طرف دیگر نزدیک به ۲۵ درصد پروتئین های میکروبی تولید شده مربوط به اسیدهای نوکلوئیک و ۷۵ درصد مابقی آن پروتئین های حقیقی میکروبی (MCTP) می باشد که تعیین کننده ارزش بیولوژیکی (BV) پروتئین میکروبی است. براساس ضرایب اعلام شده می توان فهمید که ارزش بیولوژیکی پروتئین میکروبی تولید شده و بحث درباره چگونگی تولید آن اهمیت بسزایی در تولیدات دامی دارد. پروتئین های میکروبی از طریق دی آمیناسیون اکسیداتیو جهت تولید آمونیاک (معادله ۹-۲) و گاهی از ترانس آمیناسیون جهت تولید سایر اسیدهای آمینه مورد نیاز (معادله ۱۰-۲) تولید می شوند. جهت سنتز پروتئین میکروبی نیاز به عوامل مختلفی مانند آمونیاک، انرژی، اسکلت های کربنی، کوفاکتورها، اسیدهای آمینه ضروری و پپتیدها می باشد (شکل ۹-۲).



شکل ۹-۲ سنتز پروتئین میکروبی.

بعد از ورود پروتئین و هضم آنها به پپتیدها و اسیدهای آمینه به دلیل جذب ناچیز اسیدهای آمینه از دیواره شکمبه و انباشته شدن آنها، براساس فرآیندهای معادله ۹-۲، تولید آمونیاک آغاز می گردد. آمونیاک یا یون آمونیوم تولیدی اولین شرط ساخت پروتئین میکروبی می باشد. البته لازم به ذکر است که آمونیاک مورد نیاز همواره از چهار منبع اصلی تامین می شود:

۱. آمونیاک حاصل از پروتئین حقیقی جیره که به پپتیدها و اسیدهای آمینه تجزیه می شود.
۲. آمونیاک تامینی از ترکیبات غیر پروتئینی (NPN) مانند اوره، نیترات، اسیداوریک و غیره.
۳. منابع پروتئینی حاصل از خرد کردن میکروارگانیسم ها توسط پروتوزوآها.
۴. نیتروژن موجود در هوا و ترشح شده از دیواره شکمبه و بزاق که با خوراک وارد شکمبه شده و توسط گونه ای از باکتری ها مانند متانوباکتریوم رومینانتیوم (*Metanobacterium ruminantium*) مصرف می گردد.

معادله ۹-۲: دی آمیناسیون سرین $L\text{-Serine} \rightarrow \text{Pyruvic acid} + H_2O + NH_4^+$

دی آمیناسیون ترئونین $L\text{-Threonin} \rightarrow \text{Alpha Ketobutyric acid} + NADH_2 + NH_4^+$

معادله ۱۰-۲: L-Aspartic acid + Alpha Ketoglutaric acid → Glutamate + Oxaloacetate

آمونیاک تولید شده توسط دو آنزیم باکتریایی بنام های گلوتامین سینتاز و گلوتامات دهیدروژناز در شکمبه به پروتئین میکروبی تبدیل و تثبیت می شود. بیشترین تراکم گلوتامین سنتاز زمانی است که آمونیاک خارج سلولی در حال کم شدن بوده و آنزیم مزبور جهت فعالیت تخمیری نیاز به انرژی دارد. علت افزایش آنزیم گلوتامین سینتاز تمایل زیاد این آنزیم به آمونیاک برای برقراری سنتز پروتئین میکروبی می باشد. از طرف دیگر گلوتامات دهیدروژناز در فعالیت های خود نیازی به انرژی نداشته و حتی می تواند تامین کننده انرژی میکروب ها و کاهش نیاز به انرژی را در میکروارگانیسم ها رقم زند.

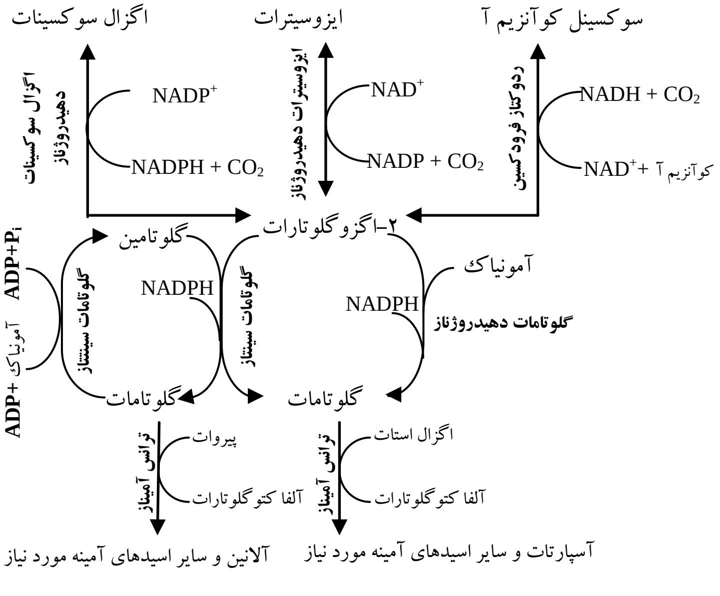
برای فعالیت پروتئین سازی، ابتدا نیاز به آلفا- کتوگلوتارات می باشد که می توان آن را از طریق سوکسنیل کوآنزیم آ توسط فرردوکسین بدست آورد. گلوتامات تولید شده از طریق آلفا-کتوگلوتارات می تواند برای سنتز اسیدهای آمینه مانند آسپارتات، پرولین، آلانین، سرین و غیره کاربرد داشته باشد. همچنین از طریق ترانس آمیناسیون می توان گلوتامات را به سایر اسیدهای آمینه تبدیل کرد (شکل ۱۰-۲). علاوه بر روند فوق، سایر اسیدهای آمینه نیز می توانند در اثر واکنش های ترانس آمیناسیون تولید اسیدآمینه جدیدی برای میکروب ها نماید. برای مثال از ترکیب دو اسیدآمینه گلیسین و آلانین در حضور فسفوانول پیروات می توان سرین را تولید نمود. همچنین اسیدهای آمینه مانند آرژنین ممکن است از واکنش یک کتواسید با نمک آمونیومی حاصل شود.

جدول ۶-۲ اسکلت کربنی مورد نیاز اسیدهای آمینه سنتز شده توسط باکتری ها.

ردیف	اسکلت کربنی	اسیدآمینه
۱	ایزووالریک	لوسین
۲	آلفا ستون گلوتارات	گلوتامات
۳	۲ متیل بوتیرات	ایزولوسین
۴	ایندول-۳-استات	تریپتوفان
۵	ایزوبوتیرات	والین
۶	فنیل استات	فنیل آلانین

هابسون و والاس، ۱۹۸۲.

لازم به توضیح است که اسیدهای آمینه سنتز شده توسط باکتری ها بوسیله اسکلت کربنی اسیدهای چرب فرار تولید می شود. جدول ۶-۲ نمونه اسکلت های کربنی مورد نیاز اسیدهای آمینه را نشان می دهد. ولی ۲۰ تا ۵۰ درصد اسیدهای آمینه مورد نیاز سنتز پروتئین میکروبی از اسیدهای آمینه و پپتیدهای تولیدی ناشی از تجزیه پروتئین های خوراکی تامین می شود.



شکل ۱۰-۲ استفاده از آمونیاک در سنتز پروتئین میکروبی.

به دلیل سنتز اسیدهای آمینه در فعالیت های تخمیری، نیاز به اسیدهای آمینه ضروری در خوراک نشخوارکنندگان وجود ندارد، اما در صورت تجدید نسل بالای میکروب ها و یا سرعت بالای عبور مواد پروتئینی از شکمبه نیاز به متیونین، لیزین، ترئونین و گاه لوسین، والین و هیستیدین بیشتر می باشد.

همچنین آزمایشات نشان داده است که ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین های میکروبی نسبتا ثابت و مستقل از پروتئین های مصرفی می باشد. این عامل بیانگر آن است که بیشتر فعالیت های ساخت پروتئین میکروبی از دی آمیناسیون است. پس از سنتز اسیدهای آمینه و جذب آن توسط میکروب ها، روند ساخت پروتئین آغاز و به چهار مرحله تقسیم می شود.

- مرحله اول، فعال سازی اسیدهای آمینه که دارای مسیر آنزیمی بوده و نیاز به ATP دارد (معادله ۱۱-۲). آنگاه گروه آمینوآسیل های تشکیل شده با RNA ناقل (tRNA) جفت می شوند (معادله ۱۲-۲). ناقلین آمینو اسیدها قدرت تشخیص و تمایز بین اسیدهای آمینه را دارا بوده، اما تشخیص در آنها ۱۰۰ درصد نمی باشد. هر دو واکنش اشاره شده توسط آنزیم آمینوآسیل سنتتاز وابسته به منیزیوم فعال می شود.

معادله ۱۱-۲: آنزیم + ATP + اسیدآمینه ← آنزیم - آمینو- آسیل-AMP + پیروفسفات

معادله ۱۲-۲: آنزیم - آمینو- آسیل-AMP + tRNA ← آنزیم + آمینو- آسیل-tRNA + AMP

سپس ناقلین اسیدهای آمینه به محل ساخت پروتئین یعنی ریبوزوم میکروارگانیسم ها حرکت می کنند. ریبوزوم ها سازه های پلیمری به نام پلی زوم را تشکیل می دهند که در آنها چند ریبوزوم بر رشته زنجیره وار RNA پیامبر (mRNA) استوار می باشند.

- مرحله دوم، شروع تشکیل پپتیدها می باشد. تشکیل پپتیدها با اسیدآمینه متیونین آغاز می شود و از اتصال tRNA با mRNA حاصل می شود. این مرحله هم با صرف انرژی زیاد و بیشتر توسط GTP صورت می گیرد.
- مرحله سوم، طویل شدن زنجیره پپتیدی تشکیل شده می باشد که با صرف انرژی فراوان GTP صورت می گیرد. پیوندهای پپتیدی در این مرحله صورت گرفته، ولی امکان پیوندهای دی سولفیدی هنوز وجود دارد.
- مرحله چهارم، خاتمه یافتن ساخت زنجیره پپتیدی می باشد. طویل شدن پروتئین تا زمانی رخ می دهد که زنجیره به کدونی برسد که کد هیچ اسیدآمینه ای وجود ندارد (مانند UAA ، UAG و UGA). زنجیره پپتیدی تشکیل شده با فرآیند هیدرولیز از سازنده خود جدا شده و شکل مارپیچ پروتئین و پیوندهای دی سولفیدی را که تشکیل دهنده ساختار پروتئین هستند، را آغاز می کند.

بعد از فرآیندهای فوق کارشناسان برآورد کرده اند که به ازای هر مول ATP مصرف شده در شکمبه، باکتری ها ۹ تا ۱۲ گرم ماده خشک سنتز می کنند که در هر ۱۰۰ گرم ماده آلی سنتز شده براساس نوع خوراک ۹/۶ تا ۳۳/۲ گرم پروتئین میکروبی سنتز می شود. البته جهت تخمین میزان پروتئین میکروبی

تولید شده در شکمبه می توان از معادلات ERDP و FME استفاده کرد که براساس نیاز میکروب ها به پروتئین و انرژی بیان می شود. اما علاوه بر معادلات فوق می توان از طریق تخمین ترکیبات پورین دار مقدار تولید پروتئین میکروبی را مشخص نمود.

الگوهای تغذیه ای ارائه شده در باب پروتئین مصرفی براساس میزان متابولیسم پروتئین در شکمبه تغییر و تکامل یافته اند که تابع نوع نیتروژن ورودی و خروجی و چرخه نیتروژن در شکمبه می باشند. در همه این الگوها نشان داده شده است که ۷۰ تا ۸۰ درصد گونه های میکروبی شکمبه به اجزای غذایی حمله و فقط ۳۰ تا ۵۰ درصد از آنها مانند باکتروئیدس آمیلوفیلوس غیر هوازی، خاصیت پروتئولایتیکی از خود نشان می دهند. این تغییر در نرخ تجزیه پذیری و میزان توسعه متابولیسم پروتئین به حلالیت پروتئین و باندهای تشکیل دهنده در آن وابسته می باشد. لذا مطالعات انجام شده درباره متابولیسم پروتئین بیشتر بر تجزیه پروتئین صورت گرفته است. این در حالی است که از اثر نهایی متابولیسم یعنی تشکیل اسیدهای آمینه و تبدیل آنها به پروتئین میکروبی غافل بوده اند. و پیشتر گفته شد که تراکم اسیدهای آمینه یکی از کلیدهای کنترل تجزیه پذیری پروتئین و بالطبع متابولیسم پروتئین می باشد. به همین دلیل دستکاری متابولیسم پروتئین در شکمبه می تواند با عدم تغییر در الگوی پروتئولیز زنجیره پپتیدها، دی آمیناسیون موجود را کنترل و متابولیسم را به نحو مطلوب تری هدایت کند. بطور مثال؛ موننسین می تواند تراکم اسیدهای آمینه و به خصوص آمونیاک را در شکمبه کنترل و از افزایش آنها به صورت نامطلوب جلوگیری و تخمیر دسته میکروب های تولید کننده آمونیاک مانند پروتولا رومینانتیوم (*Prevotella ruminantium*) یا پروتولا بریانتی (*Prevotella bryantii*) را کند نماید.

۲-۴-۴ چربی

چربی های خوراکی در جیره نشخوارکنندگان به نسبت کمتری یافت می شوند، این مقدار برحسب نوع چربی مصرفی، گونه دام و نوع خوراک مصرفی بین ۳ تا ۶ درصد ماده خشک جیره متفاوت خواهد بود. چربی های مصرفی را می توان براساس ترکیب ساختاری به سه گروه اصلی چربی های ساده حاوی گلیسرول، چربی های مرکب حاوی گلیسرول و مشتقات چربی های بدون گلیسرول طبقه بندی نمود. اما روش دیگری از طبقه بندی وجود دارد که براساس طول زنجیره کربنی تشکیل دهنده، اشباع یا عدم اشباع بودن اسید چرب، خاصیت های ایزومری، قابلیت دسترسی و تعداد زنجیره باند شده با یکدیگر می باشد. بر همین اساس نوع ورود چربی به شکمبه می تواند بر روند متابولیسم تاثیر بسزایی داشته باشد (شکل ۱۱-۲). با توجه به شکل مزبور می توان گفت اصول متابولیسم چربی در شکمبه به شرح ذیل انجام می گیرد:

۱. لیپولیز

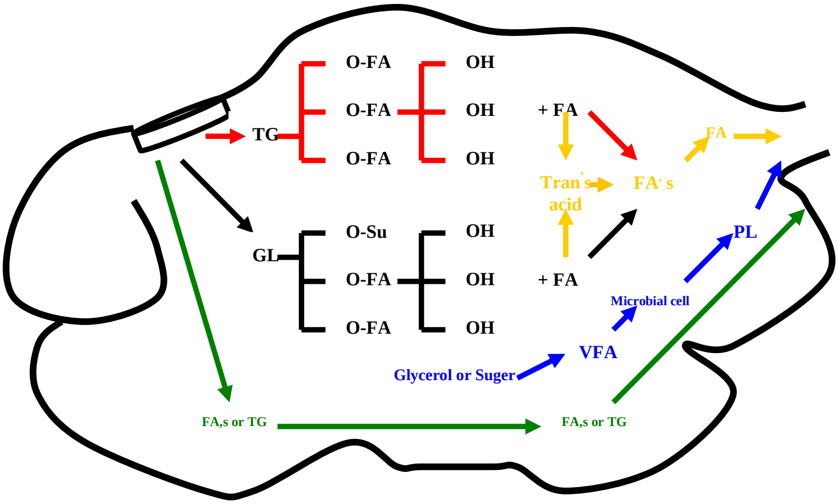
۲. هیدرولیز

۳. ایزومریزاسیون

۴. هیدروژناسیون

۵. سنتز اسید چرب

چربی ها اکثرا قطبی نبوده و محلولیت کمی در آب دارند. لذا عدم مخلوط شدن در شکمبه از مشکلات اساسی متابولیسم چربی ها می باشد. برای رفع این مشکل توصیه می شود که چربی ها به صورت ذرات تعلیقی پایدار (امولوسیون) وارد جیره و شکمبه شوند.



شکل ۱۱-۲ متابولیسم چربی در شکمبه؛ TG: تری گلیسیریدها (غلات و دانه های روغنی)، GL: گلیسرول (علوفه ها) و FAs or TG: تری گلیسریدها و چربی های عبور (چربی های فرآوری شده).

وجود املاح در جیره، انقباضات مناسب در شکمبه و نگاری، افزایش نشخوار و حرارت مطلوب می تواند از عوامل مناسب امولوسیون کننده باشند. از آنجا که چربی ها همواره در بخش سوم شکمبه یافت می شوند و این مکان جائی است که میکروارگانیسم ها به شدت به ذرات غذایی چسبیده اند. لذا تعلیق چربی در این بخش اهمیت زیادی دارد.

لیپولیز مرحله اجباری برای تغییرات بعدی چربی ها در شکمبه می باشد. ۷۵ درصد چربی ها در این مرحله بشدت مورد حمله آنزیم لیپولایتیک باکتری ها قرار گرفته و تجزیه می شوند. فقط چربی های محافظت شده از این مرحله سالم عبور می کنند. کارشناسان سهم پروتوزوئرها را در این مرحله بسیار اندک می دانند. چربی های گیاهی بویژه علوفه ها نسبت به غلات از چربی های دامی بهتر و سریعتر

تحت تاثیر لیپولایتیک قرار می گیرند. فعالیت لیپولایتیک در بخش جامد شکمبه اتفاق می افتد. بعد از فرآیند لیپولیز به سرعت فرآیند هیدرولیز آغاز می شود. گاهی سرعت هیدرولیز بعد از لیپولیز سریع است که محققا آنها را یکی فرض می نمایند.

فرآیند هیدرولیز منتج به تولید اسیدهای چرب فرار آزاد استریفه، گلیسرول آزاد و سایر مواد در صورت وجود از تری گلیسریدها، گالاکتولیپیدها و فسفولیپیدها می شود. هیدرولیز تری گلیسریدها در ابتدا برای جدا سازی اولین اسید چرب آهسته و برای سایر اسیدهای چرب با سرعت مناسب تری اتفاق می افتد. گلیسرول آزاد شده و قندها از این مرحله طی تخمیر میکروبی به اسیدهای چرب فرار تبدیل می گردند. اسیدهای چرب آزاد شده هم توسط املاح مانند کلسیم خنثی شده و به سطح باکتری ها و ذرات غذایی می چسبند. این اسیدها به عنوان انرژی مورد استفاده قرار نگرفته و در موارد بیوسنتز داخل سلولی مورد مصرف میکروب ها قرار می گیرد. فعالیت های لیپولیز (آنزیم لیپاز) و هیدرولیز (آنزیم استرآز) بیشتر توسط آنزیم های یک باکتری مشترک به نام آنایرووویبریو لیپولایتیکا اتفاق می افتد. اما سی نوع باکتری دیگر شناسایی شده اند که فعالیت های هیدرولیزی و لیپولیزی دارند، ولی تعداد کمی از آنها مانند بوتیری ویبریو فیبروسولونس قادر به هیدرولیز اسیدهای چرب زنجیر بلند می باشند.

اسیدهای چرب آزاد شده در شکمبه گاهی دارای باندهای غیراشباع چند پیوندی در زنجیره خود می باشند. این حالت سبب بروز انواع اسیدهای چرب سیس و ترانس می کند. در بین اسیدهای چرب نوع گیاهی آنها بیشتر از نوع سیس می باشد، اما اسیدهای چرب ترانس که بیشتر از نوع حیوانی هستند با ثبات تر از سیس مشاهده و از هیدروژناسیون در امان خواهند بود. فعالیت های ایزومریزاسیون سبب تبدیل اسیدهای چرب از نوع سیس به ترانس و یا بالعکس می شود. آنزیم ایزومرآز موجود در باکتری بوتیرویبریو فیبروسولونس نمونه مشهور این فعالیت می باشد. این نوع آنزیم ها در همه باکتری ها وجود دارد و در اسیدیته برابر ۶/۸ تا ۷/۲ دیده می شوند. اهمیت فعالیت ایزومراسیونی زمانی به چشم می آید که نیاز به یک اسید چرب ضروری شود، اما فعالیت هیدروژناسیونی قادر به تولید آن نباشد. مهمترین مثال در این زمینه فعالیت ایزومراسیونی است که سبب تغییر اسید لینولئیک یا لینولنیک به اسیدهای حد واسط مانند اسید واکسنیک شده و اسیدهای مزبور در اثر هیدروژناسیون زمینه تولید اسید استئاریک را فراهم نماید (شکل ۱۲-۲). بعد از تغییرات مورد نیاز اسیدهای چرب تجزیه شده، مرحله هیدروژناسیون توسط میکروب ها آغاز می شود. در این مرحله هیدروژن به زنجیره حاوی باندهای دوگانه اضافه و اسید چرب مورد نظر اشباع می شود. این عمل آنقدر اهمیت دارد که سبب پایداری میکروب ها در شکمبه و حذف هیدروژن اضافی از محیط شکمبه می گردد.

لینولئیک اسید ←(ایزومراز)← ۹ سیس ۱۱ ترانس کانژوگه لینولئیک اسید ←(ردوکتاز)← ترانس ۱۱ اولئیک اسید ←(ردوکتاز)← استئاریک اسید

شکل ۱۲-۲ هیدروژناسیون اسید لینولئیک.

عمل هیدروژناسیون بیشتر توسط باکتری ها صورت می گیرد. شواهد نشان می دهد که حذف پروتوزوئرها با افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع در شکمبه امکان پذیر است. در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است که ۲۵ درصد هیدروژناسیون در داخل سلول میکروبی و مابقی در خارج سلول می باشد. شواهد نشان می دهد که ۷۰ تا ۸۰ درصد اسیدهای چرب غیراشباع در شکمبه اشباع می شوند. این میزان از هیدروژنه شدن اسیدهای چرب به نوع خوراک مصرفی و نسبت های اقلام آن، نرخ عبور، نوع باندهای دوگانه اسیدچرب، انرژی قابل دسترس، نوع فرآوری اسیدهای چرب و تنوع باکتریایی وابسته می باشد.

کارشناسان الگویی را که براساس آن بتوان مقدار بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع را مشخص نمود به صورت معادله ۱۳-۲ ارائه دادند. مقدار بیوهیدروژناسیون به میزان مصرف اسیدهای چرب غیر اشباع، سطح تغذیه و نرخ عبور اسیدهای چرب از شکمبه وابسته می باشد. براساس شرایط ثابت نرخ بیوهیدروژناسیون در اسیدهای چرب مختلف متفاوت بوده و به ترتیب برابر است با:

$$C18:3 > C16:1 > C18:2 > C18:1t > C18:1c$$

معادله ۱۳-۲: $BHLCFA = RFLCFA \times [Kb (RFLCFA) / Kb (RFLCFA) + Kp]$

معادله ۱۴-۲: $Kb (RFLCFA) = K_b \times EXP[-B \times RFLCFA / DMI]$

مقدار اسیدهای چرب بلند زنجیره اشباع تولید شده از بیوهیدروژناسیون (گرم در روز) = BHLCFA

مقدار اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع آزاد تولید شده از لیپولیز (گرم در روز) = RFLCFA

نرخ بیوهیدروژناسیون (درصد در ساعت) = Kb

نرخ عبور (درصد در ساعت) = Kp

نرخ بیوهیدروژناسیون تصحیح شده (درصد در ساعت) = Kb (RFLCFA)

حداکثر نرخ بیوهیدروژناسیون به صورت تئوری (درصد در ساعت) = K_b

تصحیح فاکتورهای موثر بر بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب بلند زنجیره لیپولیز شده = -B

همچنین، می توان مقدار لیپولیز موجود در معادله ۱۳-۲ را از معادله ۱۴-۲ محاسبه نمود. لیپولیز بوسیله هیدرولیز گروه آسیلی باند شده در تری گلیسریدها، فسفولیپیدها، گالاکتوزیل گلیسرآلدئیدها، اسیدهای چرب باند شده و استرهای اسیدچرب تولید اسیدهای چرب آزاد می کند.

معادله ۱۵-۲: $RFLCFA = DIETLCFA \times [Klip (LCFA) / Klip (LCFA) + Kp]$

معادله ۱۶-۲: $Klip (LCFA) = K \times EXP(-L \times DIETLCFA)$

RFLCFA = مقدار اسیدهای چرب بلندزنجیره ای که از طریق لیپولیز آزاد شده اند (گرم در روز)

DIETLCFA = مقدار اسیدهای چرب بلند زنجیره مصرف شده در جیره (گرم در روز)

Klip = نرخ لیپولیز (درصد در ساعت)

Kp = نرخ عبور (درصد در ساعت)

Klip (LCFA) = نرخ لیپولیز تصحیح شده برای اسیدهای چرب بلند زنجیره در جیره غذایی (درصد در ساعت)

K = حداکثر نرخ لیپولیز به صورت تئوری (درصد در ساعت)

L- = تصحیح فاکتورهای موثر بر لیپولیز اسیدهای چرب بلند زنجیره در غذا

وقتی که مقدار L در معادله ۱۶-۲ صفر شود، مقدار Klip (LCFA) برابر K می شود. همانطور که در جدول ۷-۲ نشان داده شده است نرخ لیپولیز به شدت به نوع اقلام خوراکی و در نهایت نسبت های آنها در جیره وابسته می باشد.

جدول ۷-۲ درصد لیپولیز چربی در اقلام خوراکی.

نوع خوراک	K	L	Klip	درصد لیپولیز
علوفه یونجه	۶۵	۰	۶۵	۹۳
سیلوی یونجه	۵۰۰	۰	۵۰۰	۹۹
ذرت	۳۵	۰	۳۵	۸۳
جو	۲۹	۰	۲۹	۸۱
کنجاله سویا	۵۰۰	۰	۵۰۰	۹۹
پودر ماهی	۲۳	۰	۲۳	۷۷
چربی تالو	۵۰۰	۰/۳۷	۷۹-۵۰۰	۹۲-۹۹

اسیدهای چرب آزاد که وارد دوازده می شوند تنها از مسیر لیپولیز و بیوهیدروژناسیون تولید نمی شوند. میکروارگانیسم ها می توانند اسیدهای چرب مورد نیاز خود را که دارای زنجیره های طولانی و انشعاب دار هستند، از اسیدهای چرب تغییر یافته و سایر مواد تخمیر شده تولید نمایند. زنجیره اسیدهای چرب تک کربنه مشاهده شده در شکمبه نشخوارکنندگان از طریق ساخت میکروبی و مصرف اسیدهای چرب زوج کربنه تولید می شوند. مواد اولیه مورد نیاز در تولید اسیدهای چرب تک کربنه بیشتر اسید والریک و پروپیونیک می باشد. همچنین ساخت اسیدهای چرب زوج کربنه هم توسط میکروارگانیسم اتفاق می افتد که نهاده های اولیه مورد نیاز آنها بیشتر کاپروئیک اسید و بوتیرات است. البته انشعابات جانبی زنجیره های مذکور هم از ایزو اسیدها مانند ایزوبوتیریک و ایزو والریک اسید تولید می شوند. ساخت روزانه چربی توسط میکروارگانیسم ها تقریبا بین ۶ تا ۷ میلی گرم به ازای هر گرم ماده خوراکی عنوان شده است (شکل ۱۳-۲). این ساخت زمانی که خوراک مصرفی بیشتر از دانه ها باشد، قابل

بررسی خواهد بود. الگوی ریاضی ارائه شده جهت تخمین مقدار اسید چرب تولیدی در شکمبه بر مبنای کربوهیدرات ها در معادله ۱۷-۲ ارائه شده است.

بیشتر اسیدهای چرب تولید شده در داخل سلول میکروبی که عمدتا جهت سنتز فسفولیپیدهای غشایی بکار گرفته می شوند شامل اسید استئاریک، اسید پالمیتیک و اسید پالمیتولئیک می باشد. مقدار اسیدهای چرب تولید شده به شدت تابع سطح خوراک مصرفی و نرخ عبور آنها از شکمبه می باشد. اما در نهایت، سنتز اسیدچرب در شکمبه بیشتر در زمانی اتفاق می افتد که جیره مصرفی دارای فقر لیپیدی (جیره های پر از غلات) باشد.

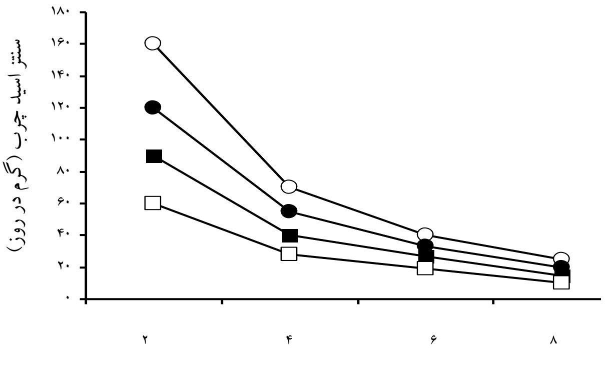
معادله ۱۷-۲: RPLCFA = LCFASYN × FTCHO × EXP [-LCFAUP × RFLCFA / DMI]

RPFLCFA = مقدار تولید اسیدهای چرب بلندزنجیره (گرم در روز)

LCFASYN = مقدار تولید یک اسیدهای چرب بلند زنجیره خاص از هر گرم کربوهیدرات قابل تخمیر

FTCHO = مقدار کربوهیدرات قابل تخمیر در شکمبه (گرم در روز)

LCFAUP = فاکتور تصحیح کننده جهت مقدار اسیدهای چرب بلندزنجیره ای که از طریق لیپولیز توسط میکروب های شکمبه آزاد شده است



شکل ۱۳-۲ تاثیر سطح خوراک مصرفی بر مقدار اسیدهای چرب تولید شده در شکمبه. ○ ۲۵ کیلوگرم ماده خشک مصرفی، ● ۲۰ کیلوگرم ماده خشک مصرفی، ■ ۱۵ کیلوگرم ماده خشک مصرفی و □ ۱۰ کیلوگرم ماده خشک مصرفی.

۲-۴-۵ مواد معدنی و ویتامین ها

عناصر معدنی در شکمبه هضم و تخمیر نمی شوند؛ بلکه عمدتا در مسیر متابولسیم سایر مواد مغذی قرار گرفته و روند آنها را کنترل می کنند. به همین دلیل هنگام استفاده از آنها باید به محلولیت در شکمبه و قابل استفاده بودن بیولوژیکی آن توجه نمود. مصرف مواد معدنی و گروه خاصی از ویتامین ها جهت رشد میکروارگانیسم های و ازدیاد آنها در شکمبه لازم است. بطور مثال؛ گوگرد و نمک های معدنی آن جهت تامین نیاز میکروارگانیسم ها برای سنتز اسیدهای آمینه گوگرد دار مانند متیونین،

ضروری است. این ماده معدنی باید به نسبت خاصی از نیتروژن و انرژی مصرف تا موثر واقع شود. استفاده از مواد معدنی از چالش های پیش رو برای کنترل تخمیر میکروبی و متابولیسم مواد مغذی می باشد. نسبت های صحیح آن برای میکروارگانیسم ها سودمند و بیش بود و کمبود هر یک از آنها سبب اختلال جدی در روند متابولیسم سایر عناصر غذایی خواهد شد. مثلا بیش بود کلسیم که سبب فعالیت آنزیم های خارج سلولی میکروارگانیسم ها می شود، سبب عبوری تر شدن چربی ها می گردد و متابولیسم آنها را با اختلال روبرو می کند. و یا بیش بود یک ماده معدنی سبب کمبود سایر عناصر معدنی در جذب خواهند شد. نهایتا رابط عناصر همواره مدنظر کارشناسان تغذیه بوده و رابط مذکور را به شکل رابط کاتیون ها (کلسیم، سدیم، منیزیم و پتاسیم) و آنیون ها (کلر، فسفر و گوگرد) عنوان می نمایند.

ویتامین های محلول در آب، مانند ویتامین های گروه ب کمپلکس، و ویتامین K محلول در چربی بوسیله میکروب های شکمبه ساخته شده و نیاز خود و دام را از این طریق تامین می کنند. اما افزودن مواد مورد نیاز جهت سنتز ویتامین مذکور اهمیت خاصی دارد. مثلا کمبود ماده معدنی کبالت، سنتز ویتامین B_{12} را کاهش و گاه متوقف می کند. کمبود B_{12} می تواند اختلال در رشد و نگهداری میکروارگانیسم ها را سبب و نهایتا کاهش تخمیر میکروبی را رقم بزند. سایر ویتامین ها مانند D،A و E می بایست در جیره قرار داشته باشند و یا پیش ساز آنها در اختیار میکروارگانیسم ها قرار گرفته تا ساخته و مورد مصرف قرار گیرند. نهایتا ویتامین ها همانند مواد معدنی در سلامت و نگهداری میکروارگانیسم ها و کنترل روند تخمیر وظایف عمده ایی دارند.

۲-۵ کنترل متابولیسم

با آشکار شدن فعالیت های هضم، تجزیه و تخمیر شکمبه ای به وسیله بررسی های به عمل آمده، کنترل متابولیسم در شکمبه تا حدودی ساده ولی پیچیده به نظر می رسد. جهت یک تخمیر مناسب و پایدار، میکروارگانیسم ها را بایستی به صورت طبیعی یا مصنوعی، براساس تغییرات پیوسته محیط های خارجی و داخلی بیمه و تنظیم نمود. برای این منظور، تعیین ارتباطات مداوم خوراک با روند تخمیر شکمبه و تولیدات آنها سبب کارایی بهتر و دوام بیشتر میکروب ها می شود. چنین ارتباطاتی سه بخش مجزا، ولی کامل را دربر می گیرد. اول؛ تطبیق دادن میکروب ها با خوراک مصرفی که باید در مدت زمان کمتری صورت گرفته تا سبب پایداری بیشتر میکروارگانیسم ها و روند تخمیر گردد. دوم؛ پذیرش گونه جدید میکروارگانیسم ها و بکارگیری از تولیدات آنها بدون حذف گونه های میکروبی سابق که بانک ژنتیکی مناسبی محسوب می شوند. این موضوع سبب می شود علاوه بر استفاده صحیح تر از

خوراک، خوراک های جدیدتر معرفی و مصرف شوند. و سوم؛ کنترل جذب و خروج مواد تولید شده توسط تخمیر براساس وظایف از قبل تعیین شده که سبب پویا تر شدن تولیدات میکروبی و مطلوب شدن محیط شکمبه می شود. جهت هماهنگی سه بخش مذکور شرایط ذیل مورد نیاز است:

۱. کنترل دائمی فلور میکروبی و آنزیم های مترشحه از آنها توسط بررسی و تعیین تولیدات تخمیری.

۲. افزودن مداوم مواد نگهدارنده تخمیر جهت بهبود کردن محیط شکمبه برای میکروارگانیسم جدید و قدیم تا زمانی که میکروب مورد نظر براساس الگوهای از پیش تعیین شده ثبات یابد.

۳. تفکیک پذیری صحیح خوراک مصرفی در زمان ورود میکروارگانیسم جدید و کنترل دقیق زمان مصرف خوراک و جایگاه تخمیر آن.

۴. اعمال مهار برگشتی متابولیسم. این معمولی ترین روش تنظیمی متابولیسم است که فعالیت آنزیمی یک میکروارگانیسم در حضور محصولات نهایی میکروارگانیسم دیگر و یا مواد مغذی دیگر مهار می گردد.

۵. تعیین تک به تک عناصر غذایی مورد نیاز میکروارگانیسم ها و منطبق کردن آن با روند پویا و دینامیک هضم و تخمیر در شکمبه.

هدف نهایی در کنترل متابولیسم شکمبه محدود نمودن فعالیت میکروب ها در دامنه خاصی از خوراک ها است که حیوان میزبان با آنزیم های گوارشی خود قادر به هضم آنها نبوده و یا بدون دخالت میکروبی نمی تواند از آنها استفاده کند. اگر چه انسان در این زمینه موفقیت هایی بدست آورده است، اما در مقایسه با این حجم مواد غذایی نامتعارف بلاتکلیف و عوامل طبیعی، موفقیت کمتری داشته است. البته لازم به ذکر است که کارشناسان مربوطه توانسته اند ابزارهای کارآمدی در آزمایشگاه طراحی و از مواد نامتعارف فوق استفاده نمایند، اما به دلیل هزینه های سنگین تجاری با شکست نسبی مواجه شده اند.

۶-۲ برای مطالعه بیشتر

- مهدی طباطبایی، م. (۱۳۸۲). جنبه های فیزیولوژی تغذیه نشخوارکنندگان. ترجمه. انتشارات بوعلی سینا. همدان.
- نوید شاد، ب. جعفری صیادی، ع. (۱۳۷۹). تغذیه دام. ترجمه. انتشارات فرهنگ جامع. رشت.

- Annison. E. and D. Lewis. (1959). Metabolism in the rumen. London: Methuen.
- Baldwin R. L. (1995). Modeling ruminant digestion and metabolism. London: Chapman and Hall;

- Bach. A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. (2005). Nitrogen Metabolism in the Rumen. J. Dairy Sci. 88: (E. Suppl.):E9–E21.
- Broderick. G. A., R. J. Wallace, and E. R. Ørskov. (1991). Control of rate and extent of protein degradation. Pages 541–594 in Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants. T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima, ed. Academic Press, New York, NY.
- Bauman. D. E., J. W. Perfield II, M. J. de Veth, and A. L. Lock. (2003). New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. Proc. Cornell Nutr. Conf. pp. 175-189.
- Bach. A., S. Calsamiglia, M. D. Stern. (2005). Nitrogen Metabolism in the Rumen. J. Dairy Sci. 88 :(E. Suppl.): E9–E2.
- Clark, J. H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. J. Dairy Sci. 75:2304– 2323.
- Church. D. C. (1988). The ruminant animal. Englewood cliffs, New Jersey 07632.
- Carroll E. J. and R. E. Hungate. (1954). The magnitude of the microbial fermentation in the bovine rumen. Appl Microbial. 2:205–14.
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. L. Berger, R. I. Mackie, G. C. Fahey. (1991). Effects of dietary energy level and protein source on nutrient digestion and ruminal nitrogen metabolism in steers. J. Animal. Sci. 69:2230.
- Cotta, M. A. & J. B. Russell. (1997). Digestion of nitrogen in the rumen: A model for metabolism of nitrogen compounds in gastrointestinal environments. In: Mackie, R. I. & B. A. White (eds) Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations, vol. 1. Chapman and Hall, New York, NY, pp. 380-423.
- Dunshea F. R. (1993). Effect of metabolism modifiers on lipid metabolism in the pig. J Anim Sci. 71:1966–77.
- Dijkstra, J., J. France, D. R. Davies (1998). Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. J. Dairy Science, 81: 3370-3384.
- El-Shazly, K., R. E. Hungate. (1965). Fermentation capacity as a measure of net growth of rumen microorganisms. Appl. Microbial. 13: 62.
- Faichney. G. J. (1993). Digesta flow. Pages 53–86 in Quantitative Aspects of ruminant Digestion and Metabolism. J. M. Forbes and J. France, ed. CAB international, Wallingford, UK.

- Firkins, J. L. (1996). Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. Journal of Nutrition, 126: 1347-1354.
- Jenkins. T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. J Dairy Sci 76:3851-3863.
- Harfoot. C. G. (1981). Lipid metabolism in the rumen. In: W. W. Christie (ed.) Lipid Metabolism in Ruminant Animals. pp 21-55. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK.
- Harfoot. C. G. and G. P. Hazlewood. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In: P. N. Hobson and C. S. Stewart (ed.) the Rumen Microbial Ecosystem. pp 382-426. Chapman & Hall, London, UK.
- Hoover, W. H., S. R. Stokes. (1991). Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. J. Dairy Sci. 74:3630.
- Hungate, R. E. (1966). The Rumen and Its Microbes. Academic Press, New York, NY.
- Lapierre, H., G. E. Lobley. (2001). Nitrogen recycling in the ruminant: A review. J. Dairy Sci. 84 (E. Suppl.): 223-236.
- Leng, R. A., J. V. Nolan. (1984). Nitrogen metabolism in the rumen. SYMPOSIUM: PROTEIN NUTRITION OF THE LACTATING DAIRY COW. J. Dairy Sci 67:1072-1089.
- McAllen. A. B. and R. H. Smith. (1974). Carbohydrate metabolism in the ruminant. J. Nutr. 77.
- Moate. P. J., R. C. Boston, and W. Chalupa. (2001). Validation of a Model for the Digestion of Fat in Dairy Cows. J. Dairy Sci. 84(Suppl.1):352.
- Newbold. J. R. and S. R. Rust. (1992). Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. J. Anim. Sci. 70:538–546.
- Oldick, B. S., J. L. Firkins. (2000). Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. J. Animal Sci. 78: 2412-2420.
- Ørskov, E. R., M. Ryle. (1990). Energy nutrition in ruminants. Elsevier Applied Science, London.
- Ørskov, E. R. (1992). Protein nutrition in ruminants. Second edition, Academic Press.
- Poore, M. H., J. A. Moore, R. S. Swingle. (1990). Differential passage rates and digestion of neutral detergent fiber from grain and forages in 30, 60 and 90% concentrate diets fed to steers. J. Anim. Sci. 68:2965.
- Rafael. A. N. and C. B. Donald. (2007).Carbohydrate and Lipid Metabolism in Farm Animals. J. Nutr. 137: 702–705.

- Van Soest, P. J., 1994; Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Walker, D. J., C. J. Nader. (1968). Method for Measuring Microbial Growth in Rumen Content. J. Gen. Microbiology. Vol: 16. 1124-1131.

فصل سوم

میکروارگانیسم های شکمبه

۱-۳ طبقه بندی میکروارگانیسم ها	۹۱
۲-۳ رشد و تغذیه میکروارگانیسم ها	۹۶
۳-۳ محل قرارگیری و چگونگی فعالیت میکروارگانیسم ها	۱۰۲
۴-۳ فرآیند تخمیر و الگوهای آن	۱۱۸
۵-۳ برای مطالعه بیشتر	۱۳۸

میکروارگانیسم های شکمبه

شکمبه با ایجاد سازوکارهای تنظیم کننده، محیط مناسبی را برای گسترش و تکثیر میکروارگانیسم ها فراهم می نماید. این سازوکارها شامل رطوبت، دما، اسیدیته، شرایط بی هوازی و فشار اسمزی می باشد. کارشناسان رطوبت مورد نیاز جهت تخمیر را ۸۵-۸۰ درصد و دمای مطلوب برای فعالیت های میکروارگانیسمی را ۳۸ تا ۴۲ درجه سانتیگراد عنوان می نمایند. اسیدیته مطلوب هم جهت پایداری و پویایی روند تخمیر نزدیک به خنثی بوده (pH ۷-۶) و فشار اسمزی مورد نیاز هم براساس نوع خوراک مصرفی و زمان مصرف تعیین می گردد (به طور متوسط ۳۰۰ mOsm/L). دامنه فشار اسمزی قبل از مصرف خوراک ۳۰۰-۲۵۰ میلی اسمز در هر لیتر مایع شکمبه و بعد از مصرف خوراک ۴۰۰-۳۵۰ میلی اسمز در هر لیتر از مایع شکمبه می باشد. اکسیژن موجود در شکمبه هم که توسط خوراک وارد محوطه تخمیر شده است، به سرعت از بین رفته تا حالت بی هوازی محیط شکمبه حفظ گردد. در غیاب اکسیژن، کربن گیرنده یون های هیدروژن می باشد. بیشترین مقدار گازهای موجود در شکمبه مربوط به دی اکسیدکربن (۶۵ ٪) بوده و متان (۲۷٪)، ازت (۷٪)، اکسیژن (۰/۶٪) و هیدروژن (۰/۲٪) در ردیف های بعدی قرار دارند.

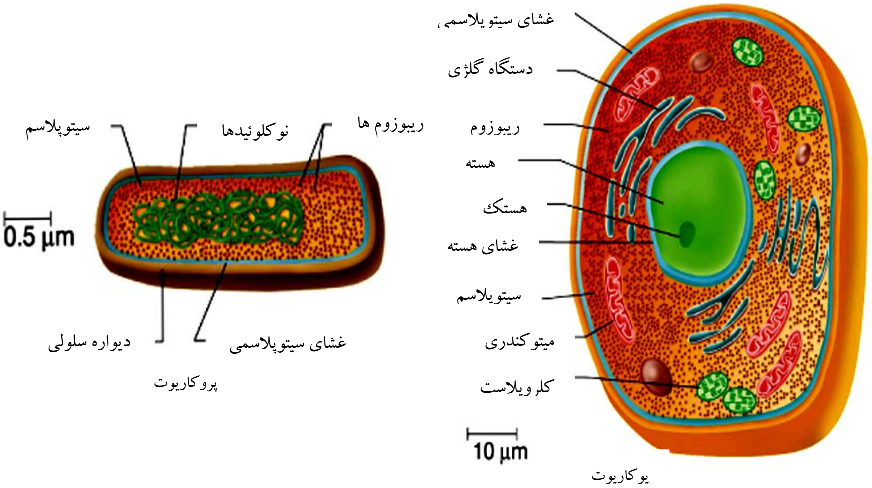
بررسی وضعیت میکروبی شکمبه و شبیه سازی آن به دلایل ویژه با مشکل و پیچیدگی های خاصی روبرو می باشد. زیرا تعادل گونه های میکروبی بواسط تغییر نوع جیره و مدت زمان مصرف متفاوت و حتی تحت تاثیر روابط متقابل میکروبی قرار می گیرد. بعضی میکروب ها از لحاظ مصرف اکسیژن انتخابی بوده و براساس شرایط تغییر می کنند. اما اکثر میکروارگانیسم ها بی هوازی بوده و برای کار با آنها در آزمایشگاه باید شرایط بی هوازی طراحی گردد. در نهایت می توان گفت به دلیل رابطه های درونی و اساسی بین مواد حاضر و میکروب های مختلف که در شرایط آزمایشگاهی کمتر بوجود می آید، تحقیقات ارائه شده درباره تنوع گونه های میکروبی دارای اختلافاتی فاحشی با واقعیت خواهد بود.

از آنجا که توده میکروبی ساخته شده در شکمبه حدود ۳۰-۲۰ درصد از مواد مغذی جذب شده بوسیله نشخوارکنندگان را شامل می شود، ترکیب میکروارگانیسمی اهمیت زیادی پیدا می کند. جمعیت میکروبی و تناسب آن در نشخوارکنندگان کوچک (گوسفند، بز و ...) و بزرگ (گاو، گاومیش و ...) عموما مشابه بوده و این تشابه مشروط بر دریافت غذایی مشابه می باشد. به همین دلیل به ازای هر واحد وزن شکمبه، نرخ تخمیر در نشخوارکنندگان کوچک بیشتر است. کارشناسان علت آن را مربوط به متابولیسم دام برحسب وزن متابولیکی می دانند.

۱-۳ طبقه بندی میکروارگانیسم ها

محققین تقریبا ۱۷۰ سال است که به مطالعه میکروارگانیسم های شکمبه و نحوه فعالیت های آنها می پردازند. شکمبه شامل یک اکوسیستم بسیار پیچیده ای است که تعداد متفاوتی از میکروب ها را در خود جای داده و جهت تخمیر مواد غذایی آنها را بر یک سو هدایت می کند. اکوسیستم میکروبی شکمبه همواره ثابت و در بعضی از زمان ها متغیر و پویا می گردد. اکوسیستم ثابت شکمبه عبارتنداز تاسیس و ثبات فعالیت های میکروبی جهت تولید اسیدهای چرب فرار می باشد. اما اکوسیستم پویا و متغیر شکمبه بوسیله تغییرات مداوم جمعیت میکروبی ناشی از خوراک مصرفی، آب و هوا و گاه نوع میزبان بوجود می آید. در یک نشخوار کننده سالم با وجود اینکه میلیون ها میکروب هر روز شکمبه را به واسطه غذا، نوشیدن، آب و هوا مورد حمله قرار می دهند، اما آلودگی اکوسیستمی اتفاق نمی افتد. علت آن مربوط به پایداری اکوسیستم پویا توسط میکروب های مفید است که بر اثر تغییرات جیره تغییر می کنند و سازگار می شوند.

محققین صدها نوع میکروارگانیسم از شکمبه دام های نشخوارکننده جدا نموده اند که همه آنها متعلق به سلسله پروتیست ها و عمدتا تک سلولی و گاه چند سلولی می باشند. پروتیست ها خود به دو گروه عمده یوکاریوت ها یا پروتیست های عالی با هسته مشخص (آلگ ها، میست ها و پروتئوزوئرها) و پروکاریوت ها یا پروتیست های پست با هسته نامشخص که خود به دو گروه عمده باکتری ها (Bacteria) و آلگ آبی (Archaea) تقسیم می شوند، طبقه بندی می شوند (شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳ تفاوت سلولی بین یوکاریوت ها و پروکاریوت ها

آلگ آبی خود به سه نوع متفاوت تقسیم می شود که گروه متان سازها معروف ترین آنها می باشد. این تقسیم بندی بصورت کلی و براساس خصوصیات ظاهری یا ریخت شناسی مانند میله ای یا کروی

بودن، قدرت رنگ پذیری، قابلیت حرکت، فعالیت های شیمیایی- فیزیکی مانند متان ساز بودن و یا هوازی و غیر هوازی بودن، ماده اولیه مورد استفاده (جدول ۱-۳) و ساختار درون سلولی میکروارگانیسم ها، وضعیت ژنتیکی مانند داشتن DNA، RNA و یا شجره ژنتیکی آنها صورت گرفته است. براساس این طبقه بندی است که می توان تنوع میکروارگانیسمی را شناسایی و گونه مورد نظر را براساس شباهت های موجود انتخاب و مایه کوبی نمود.

جدول ۱-۳ منابع تامین انرژی در میکروارگانیسم ها

ردیف	مواد طبقه بندی	نوع طبقه بندی	توضیحات
۱	منبع کربنی		
		اتوتروف ها	زنجیره کربنی از دی اکسیدکربن تامین می شود.
		هتروتروف ها	زنجیره کربنی از ترکیبات آلی تامین می گردد.
۲	منبع انرژی		
		فتوتروف ها	انرژی از خورشید و منابع نوری تامین می شود.
		کیموتروف ها	انرژی از ترکیبات آلی و کانی تامین می گردد.
۳	منبع الکترونی		
		لیتوتروف ها	الکترون از ملکول های کانی تامین می شود.
		ارگانوتروف ها	الکترون از منابع آلی تامین می گردد.

اقتباس از هارلی و کلین، ۲۰۰۵

اگر چه در شکمبه انواع وافری از میکروارگانیسم ها دیده می شود، ولی همه آنها را می توان در چهار ردیف کلی باکتری ها، پروتوزوئرها، قارچ های بی هوازی و سایر میکروارگانیسم ها مانند باکتریوخوارها و مایکوپلاسماها طبقه بندی نمود. فاکتورهای فراوانی در شناسایی تنوع و طبقه بندی میکروارگانیسم ها نقش دارند که امروزه اندکی از آنها بررسی شده اند. گاهی دو گونه میکروبی به دلیل ضعف در شناسایی دقیق آنها یکی نام برده می شوند، اما در هنگام حضور یک ماده غذایی فرآورده های متفاوتی از آنها تولید می گردد.

در هر میلی لیتر از محتویات شکمبه تعداد $۱۰^{۹} - ۱۰^{۱۱}$ باکتری وجود دارد. در این تعداد بیش از ۶۰ گونه باکتریای از نوع بی هوازی در شکمبه شناسایی شده است که فاقد توانایی تولید اسپور هستند. اما تعداد کل باکتری ها و جمعیت نسبی هر گونه از آنها براساس جیره حیوان بسیار متفاوت بوده و تقریبا ۱۰ درصد کل حجم شکمبه را تشکیل می دهند. پروتوزوئرها از سال ۱۸۴۳ میلادی مورد توجه محققان قرار گرفته است که در هر میلی لیتر از مایع شکمبه $۱۰^{۵}$-$۱۰^{۶}$ میکروارگانیسم را شامل می شوند. پروتوزوئرها به دو گروه عمده مژک دار و تاژک دار طبقه بندی می شوند که جمعیت گروه مژک دار

غالب بر تاژک داران می باشد. اگر چه تعداد پروتوزوئرها در شکمبه کمتر از باکتری ها هستند، اما به دلیل جثه بسیار بزرگتر آنها از لحاظ حجمی هم ردیف باکتری ها بوده و ۱۰ درصد حجم شکمبه را احاطه می کنند.

قارچ های شکمبه نزدیک به ۲۰ سال است که بطور جدی مورد مطالعه قرار گرفته اند. این دسته از میکروارگانیسم ها به شدت غیرهوازی بوده و چرخه زندگی آنها شامل یک مرحله متحرک (به صورت یک زئوسپور) و یک مرحله رویشی (اسپورانجیوم) است. مرحله رویشی سبب نفوذ ریزوئیدها به دیواره سلولی می شود. چندین گونه شناسایی شده از قارچ ها بیشتر به جنس نئوکالیماستیکس تعلق داشته است، اما کارشناسان قارچ های شکمبه را به سه جنس اصلی طبقه بندی نموده اند. کارشناسان مقدار قارچ های بی هوازی شکمبه را براساس شرایط مختلف ۱۰ تا ۲۰ درصد از توده زنده میکروبی می پندارند.

کارشناسان دسته ایی دیگر از میکروارگانیسم ها بنام باکتریوخوارها (ویروس های متصل به باکتری) را شناسایی کرده اند که تقریبا تعداد آنها بسیار متغیر و در هر میلی لیتر مایع شکمبه $۱۰^{۳}$ و گاهی $۱۰^{۸}$ تخمین زده اند. این باکتریوخوارها می توانند به نحو مطلوبی سبب ترن آور میکروارگانیسم ها به خصوص باکتری ها به صورت خرد کردن آنها شود. باکتریوخوارها سبب آزاد سازی پروتئین های میکروبی شده و امکان دسترسی آن را بیشتر فراهم می کند.

۱-۱-۳ شناسایی و درصد حضور میکروارگانیسم ها از طریق تکنیک مولکولی زیستی

خاصیت مشارکتی، رقابتی و سایر رفتارهای میکروارگانیسمی در میان گروه های مختلف میکروبی و حتی میان جنس های مختلف از یک گروه یکسان سبب شده است تعیین نقش هر یک از میکروب های موجود در شکمبه و طبقه بندی آنها پیچیده و مشکل گردد. به همین دلیل تعیین تعداد گونه های باکتری در اکوسیستم شکمبه (برای تعیین نقش آنها در تخمیر شکمبه ای) با تکنیک های معمول و سنتی مانند خصوصیات ظاهری، تولیدات نهایی، فاکتورهای رشدی، مواد مغذی مورد استفاده و حرکت مشکل می باشد. علت مشکلات موجود تعداد زیاد تست های بیوشیمیایی خاص برای هر گونه میکروبی می باشد، که حتی در مورد بعضی از میکروب های غالب موجود در اکوسیستم شکمبه دقت کافی هم ندارد. این معضل ممکن است به دلیل فشار انتخاب محیط کشت استفاده شده برای شمارش میکروب ها باشد. چون تعداد نسبی این میکروب ها زمانی که در یک محیط کشت داده می شوند، در مقایسه با فعالیت متابولیکی در اکوسیستم تغییر خواهد کرد. علاوه بر این، بخش خیلی زیادی از میکروب های شکمبه غیر قابل کشت می باشند، اما در تخمیر شکمبه ای فعال هستند. این سبب می شود که تعداد کل باکتری های زنده بر روی یک محیط کشت خاص نسبت به شمارش میکروسکوپی باکتری ها در

شکمبه به میزان زیادی کمتر باشد. از طرف دیگر، یک محیط کشت واحد قابل دسترس وجود ندارد که بتواند رشد تمام باکتری های قابل کشت شکمبه را حمایت کند. به هر حال، اطلاعات موجود در مورد باکتری های قابل کشت شکمبه کامل نیست. لذا، طبقه بندی باکتری های شکمبه بر پایه ویژگی های فنوتیپی و تست های بیوشیمیایی برای مطالعه تنوع میان ارگانیسم های زنده قابل کشت کافی نمی باشد. زیرا مطالعات نشان می دهد که باکتری های *Prevotella ruminicola*، *Butyribirio fibrisolvens* و *Ruminococcus* که بیان کننده تکامل نژادی گروه های مختلف باکتری ها می باشند، از نظر فنوتیپی و بیوشیمیایی شبیه یکدیگر هستند.

به دلیل همین شباهت ها و مشکل شدن طبقه بندی میکروارگانیسم ها حتی بین گونه های یک خانواده میکروبی، تقریبا بیش از ۵۰ سال است که بطور مستمر و گسترده بر روی اکولوژی شکمبه از طریق تکنیک های ملکولی زیستی تحقیقات صورت می گیرد. براساس این تحقیقات بیشترین گونه میکروارگانیسمی غالب شکمبه باکتری ها بوده اند. پروتوزوئرها، قارچ ها و باکتریوخوارها در ردیف های بعدی قرار دارند. چنین تنوعی در تعداد میکروب های شکمبه می تواند با بکارگیری کاوشگرهای DNA، RNA، الیگونوکلئوتیدهای مختلف مانند هومولوگ های برخی از 16S rRNA باکتری ها و بازهای نوکلوتیدی سیتوزین و گوانین، مطالعه شود. کاوشگرها در کل می توانند برای تخمین کل توده میکروبی هم بکار گرفته شوند. امروزه به دلیل خطاهای موجود در روش های اعلام شده در فوق کارشناسان از تکنیک های ژنتیکی PCR مانند Multiplex-PCR (فقط یک جایگاه ژنی مورد بررسی قرار می گیرد)، RT-PCR (رونویسی معکوس بیشتر برای RNA)، ARMS-PCR (برای مشخص کردن جهش های ژنی نقطه ای کاربرد دارد)، Nested-PCR (در این روش از دو جفت پرایمر استفاده می گردد) و real-time PCR استفاده می کنند. real-time PCR نسبت به سایر روش‌های متداول PCR مزایایی دارد که مهمترین آن‌ها شامل:

۱- میزان محصول در هر چرخه قابل ردیابی است. در حالی که محصول روش‌های سنتی پس از پایان واکنش و الکتروفورز مشخص می شد. ۲- امکان بررسی و آنالیز چند رونوشت متفاوت در یک لوله امکان پذیر است. ۳- حساسیت و دامنهٔ دینامیکی آن ۱۰۰۰ برابر RT- PCR سنتی است. ۴- به کمک این تکنیک می‌توان ارزش گذاری کمی انجام داده و میزان الگوی اولیه را دقیقاً تخمین زد. اما در کنار این مزایا می‌توان به ناتوانی این تکنیک در برآورد دقیق اندازهٔ محصول تکثیر شده در غیاب فلورسنت و پر هزینه بودن آن اشاره کرد.

تکنیک های ملکولی زیستی تا به امروز ۳۵۰۰ ژنوم ریبونوکلئیک اسید ریبوزومی (16S (rRNA از طریق real-time PCR شناسایی نموده است، که تقریبا ۶۲ درصد وزن ریبوزوم ها را بخش ژنتیکی آن

یعنی RNA تشکیل می دهد. (S) در اینجا نشانه ضریب ثابت سوئدبرگ (Svedberg) می باشد، که واحد اندازه گیری اطلاق می گردد. از آنجا که در بین سال های ۱۹۶۵ تا ۱۹۷۰ محققین متوجه شدند که فقط بعضی از قسمت های rRNA کاملا در برابر انتقال ژنتیکی محافظت می شود، لذا سلسله فعالیت های شناسایی فقط بر روی آنها انجام گرفت. براساس میزان حساسیت بخش 16S rRNA می توان از تکنیک های real-time PCR و کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی برچسب خورده با فلوروسنت پی به وجود نوع ژنوم باکتری برد. این روش به PCR نسخه‌برداری معکوس نیز معروف است که ماده اولیه در آن RNA می باشد. اولین مرحله در این روش تبدیل RNA به DNA (DNA که مکمل توالی های mRNA است) توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) صورت است. سپس مراحل شناسایی از طریق DNA انجام می گیرد. برطبق همین شیوه در جهت شناسایی و طبقه بندی ریبوزوم های پروکاریوتی مبانی سوئدبرگ ضریب 70S را در باکتری ها نشان می دهد، در حالیکه ریبوزوم های یوکاریوتی بزرگتر و 80S هستند. زیر واحدهای ریبوزوم پروکاریوتی، 30S و 50S شناسایی شده اند. زیر واحد 30S دارای 16S rRNA (در باکتری ها) بوده و زیر واحد 50S حاوی 23S rRNA (در آلگ ها) و 5S rRNA (در اکثر گونه های باکتریایی) می باشد. لازم به ذکر است RNA ریبوزومی در یوکاریوت ها بزرگتر مشاهده می شود (بطور مثال؛ 18S rRNA و 28S rRNA در برابر 16S rRNA). اولین بار جهت مطالعات طبقه بندی باکتری ها محققین بخش 5S rRNA را مدنظر قرار دادند. این روش در تقسیم کردن سه شاخه اصلی مناسب بود، اما در تفاوت گذاشتن بین گونه های مختلف باکتریایی به دلیل کوتاه بودن زنجیره ضعیف عمل می کرد. لذا محققین بخش 16S و 23S را که دارای زنجیره های طولانی تری هستند، مورد ارزیابی قرار دادند. اولین بار آنالیز rRNA به طور مستقیم برپایه قابلیت رونویسی و تشکیل یک زنجیره دیگر بنیان گذاری شده بود.

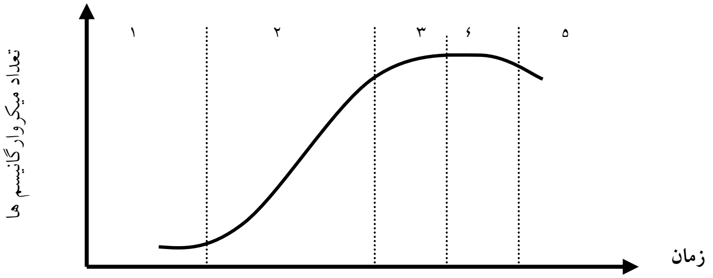
به کمک این شیوه علاوه بر شناسایی نوع و گونه باکتری جهت طبقه بندی کارآتر می توان به میزان پراکنش آنها بر روی مواد مغذی و میزان گسترش آنها در تخمیر پی برد. در این تکنیک نیز اصول کلی PCR حاکم است ولی نکته حائز اهمیت این است که پس از تکثیر RNA در هر سیکل، غلظت دقیق آن اندازه گیری می شود. در این تکنیک از رنگ هایی استفاده می شود که پس از اتصال به ساختار رشته ای، نور فلورسنت منتشر می کند. بنابر این در طی واکنش PCR، به موازات افزایش غلظت RNA، میزان فلورسانس در محلول افزایش می یابد. با اندازه گیری شدت نور فلورسنت در انتهای هر سیکل، نهایتا یک منحنی بدست می آید. سپس با استفاده از نمودارهای استاندارد، غلظت RNA هدف در نمونه مورد مطالعه محاسبه می شود. لازم به ذکر است که رنگهایی نظیر *SYBR Green* به تمام انواع DNA دو رشته ای و RNA، از جمله محصولات غیر اختصاصی PCR و حتی دیمرهای پرایمر

(*Primer dimers*) نیز متصل می شوند و این موضوع موجب کاهش اختصاصی بودن در نتایج حاصل می گردد. یک کاوشگر مخصوص گونه می تواند به منظور تخمین سهم نسبی کل rRNA از یک گونه میکروبی خاص استفاده گردد. همان طور که نسبت 16S rRNA به کل RNA سلولی در روی منحنی رشد تغییر نمی کند، 16S rRNA می تواند به عنوان یک معیار جمعیت کل باکتریایی در شکمبه استفاده گردد. کاوشگرهای خاص DNA می توانند برای یک گونه باکتریایی واحد در یک جمعیت مخلوط بکار گرفته شود، به شرطی که تراکم باکتریایی مورد بررسی بیش از ده میلیون سلول در هر میلی لیتر ازمحتویات شکمبه باشد. تاجیما و همکاران در دانشگاه ایلینویز آمریکا، برای اولین بار real- PCR time را در اکولوژی میکروبی شکمبه برای ۱۳ گونه میکروبی طراحی کردند و فهمیدند که این روش می تواند یکی از مهمترین تکنیک ها برای مطالعه تنوع در تعداد نسبی میکروب ها، ناشی از تغییرات جیره باشد. همچنین برای مطالعه استقرار گونه های بهبود یافته از باکتری های ویژه در شکمبه و یا گونه میکروبی جدید جدا شده هم می توان از این تکنیک استفاده نمود. براساس روش PCR و شناسایی 16S rRNA محققین توانسته اند بیش از ۳۵۰۰ ژنوم 16S rRNA میکروبی شامل باکتریایی و پروتوزوئری را شناسایی نمایند. تا سالهای اخیر تصور می شد که در شکمبه به حیوانات تغذیه شده با جیره غنی از نشاسته، باکتری استرپتوکوکوس بوویس به عنوان باکتری استفاده کننده از نشاسته غالب می باشد ، امامطالعات با real time PCR نشان داد که تعداد باکتری استرپتوکوکوس بوویس در زمان تغییر جیره از پایه علوفه به کنسانتره در اکثر حیوانات تحت تاثیر قرار نمی گیرد ولی به جای آن باکتری استفاده کننده از اسید لاکتیک یعنی مگاسفرا السدنی افزایش می یابد. در نتیجه در شکمبه غلظت لاکتات کمتر وپروپیونات بیشتر می گردد. به هر حال، با استفاده از تکنیک های بیولوژی مولکولی جدیدتر، می توان نقش متابولیکی مطرح شده برای گروه های مختلف باکتریایی را تغییر داد و درسالهای جدید الگوی میکروبیولوژی شکمبه به طور کامل دچار دگرگونی خواهد شد.

۲-۳ رشد و تغذیه میکروارگانیسم ها

رشد و نمو میکروارگانیسم ها براساس نوع گونه تشکیل دهنده متفاوت است. درباره نوع رشد میکروارگانیسم ها و تعاریف آن نظرات مختلفی وجود دارد. رشد و نمو می تواند از بلوغ کامل سلول میکروبی بعد از تقسیم سلولی جهت تکثیر تعریف و تا افزایش تعداد آنها معنی یابد. اما در نهایت ساده ترین تعریف رشد میکروارگانیسم ها در شکمبه افزایش تعداد آنها می باشد. حال براساس تعریف رشد می توان گفت که سرعت رشد در تک تک میکروارگانیسم ها متفاوت خواهد بود، اما روند کلی رشد جمعیت در همه آنها با هم برابر و شامل چند مرحله اساسی است. شکل ۲-۳ مراحل مختلف رشد

جمعیت میکروبی را در شکمبه نشان می دهد. همانطور که در این شکل اشاره شده است، الگوی رشد جمعیت میکروب ها به صورت یک منحنی سیگموئیدی (S شکل) بوده و جنبه های مختلفی بر روند این منحنی اثر می گذارد. یکی از این جنبه ها، اثر متقابل میکروارگانیسم ها بر روی رشد همدیگر می باشد که می تواند اثر مثبت و یا منفی داشته باشند. جنبه های دیگر شامل اثرات متقابل مواد مغذی موجود در خوراک، شرایط مختلف فیزیولوژیکی حیوان، محیط شکمبه و شرایط محیطی خارج از دام می باشد.



شکل ۲-۳ منحنی سیگموئیدی رشد میکروارگانیسم ها

مراحل مختلف اشاره شده در شکل ۲-۳ به شرح ذیل می باشد:

* مرحله اول، تاخیری (Lag time)؛ در این مرحله میکروارگانیسم ها برای تقسیم و رشد اجزای درونی خود که شامل مضاعف شدن عناصر ژنتیکی و اندام داخلی می باشد، آماده می شوند. در این مرحله رشد جمعیتی وجود نداشته و طولانی شدن این مرحله به دوره سازگاری میکروارگانیسم ها در شرایط محیطی جدید شکمبه و نوع خوراک مصرفی دارد. سرعت رشد در این مرحله بطئی و قابل مشاهده نیست. شناسایی این دوره وابسته به رنگ آمیزی های آزمایشگاهی و بررسی عناصر داخل سلولی میکروب ها می باشد. سوخت و ساز میکروب در این مرحله کامل و فقط تکثیر در آنها صفر می باشد.

* مرحله دوم، رشد سریع لگاریتمی؛ مدت زمان این مرحله وابسته به حضور مواد غذایی در شکمبه دارد. در این مرحله تعداد میکروارگانیسم های شکمبه به سرعت دو یا سه برابر می شود. سرعت ازدیاد میکروارگانیسم ها تا زمانی که نسبت مواد مغذی مورد دسترس به تعداد میکروب ها بیشتر بوده و مواد سمی اطراف آنها کم و ناچیز باشد، ادامه خواهد داشت.

* مرحله سوم، رشد آهسته؛ سرعت رشد و ازدیاد میکروارگانیسم ها در این مرحله به دلیل کاهش مواد مغذی مورد مصرف، افزایش مهار کننده های ترشح شده از میکروارگانیسم ها و حضور تولیدات تخمیری کم می باشد. در این مرحله، رشد تقریبا بطئی و صرفا جهت تکمیل و بازسازی جمعیت گونه

های میکروبی است که می توانند سریعتر به شرایط جدید عادت نمایند. در این مرحله خرد کردن میکروب ها توسط سایر میکروارگانیسم ها جهت ترن آور مواد مغذی به شدت انجام می گیرد.

* مرحله چهارم، رشد صفر؛ به دلیل توازن و تعادل برقرار شده بین نرخ رشد و نرخ مرگ میکروارگانیسم ها، رشد ثابت و یا صفر می باشد. مدت زمان این دوره کوتاه و فعالیت های دستگاه گوارشی بخصوص نرخ عبور شکمبه اثر مستقیم روی این زمان خواهد داشت. فعالیت های مربوط به خرد کردن میکروارگانیسم ها در این بخش کم کم کاهش می یابد. در این مرحله می توان به شناسایی باکتری های عادت یافته با محیط شکمبه پرداخت. در صورت برقراری میکروب با شرایط مناسب محیطی هنوز توانایی بازگشت رشد فعال را دارد. در مرحله رکود، میکروب ها نسبت به آنتی بیوتیک ها یا سایر موادی که بازدارنده فرآیندهای سوخت و ساز هستند، حساسیت کمتری نشان می دهند. میکروب در این مرحله خود را آماده هاگ زایی می نماید.

* مرحله پنجم، کاهش جمعیت؛ در این مرحله تعداد میکروارگانیسم ها کاهش می یابد. این کاهش بیشتر به دلیل کاهش مواد مغذی مورد نیاز میکروب ها و افزایش بیش از اندازه محدود کننده های رشد و تولیدمثل می باشد.

هدف اصلی از بحث و بررسی نوع و امکانات رشد میکروب ها در شکمبه، نشان دادن این امر است که چگونه احتیاجات غذایی رشد حیوان با رشد میکروارگانیسم ها منطبق می شود. و چگونه الگوهای ارائه شده در بخش تغذیه براساس طبیعت حیوان جهت تغییر فلور میکروبی تغییر می یابند. لذا کارشناسان معتقدند که می توان بر پایه تولیدات میکروبی مانند اسیدهای چرب فرار به میزان و نوع رشد میکروارگانیسم های شکمبه پی برد. این روش از شناسایی جهت تعیین رشد میکروبی را رشد شیمیایی می نامند. یک عامل در موضوع رشد شیمیایی نهفته است که مربوط به سرعت رشد عمومی میکروارگانیسم ها می باشد. ترکیب شیمیایی موجود در شکمبه می تواند تا حدی به شناسایی و تعیین گونه های فعال میکروبی و میزان پراکنش آنها کمک کند. بطور مثال؛ افزایش اسید چرب پروپیونیک نشان از افزایش فعالیت باکتری های آمیلولایتیک در مقابل سلولایتیک می باشد.

علت اصلی بکارگیری رشد شیمیایی توسط محققین که تحت اثر مستقیم نوع خوراک مصرفی می باشد، دو جنبه دارد. (۱) استفاده مناسب از منابع قابل تغذیه جهت رسیدن به حداکثر رشد میکروارگانیسم های مورد نظر در شکمبه. سرعت رشد هر میکروارگانیسم توسط مصرف خاصی از عناصر غذایی و بویژه انرژی آن کنترل می شود. انرژی همانطور که قبلا شرح داده شده است در واقع تنظیم کننده تولید و رشد میکروارگانیسم ها بوده و هر دو دسته تغییرات طبیعی و تحمیلی آن در سرعت ازدیاد میکروب ها بازتاب خواهد داشت. و (۲) تولید و یا نگهداری از یک میکروارگانیسم خاص که

تازه وارد شکمبه شده است و یا قبلا حضور داشته و براساس نیاز لازم به تکثیر بیشتر آن می باشد. گاهی دو جنبه مورد نظر در قالب یک هدف واحد یعنی بکارگیری حداکثر نیرو جهت افزایش تعداد و تولیدات میکروبی ترکیب می گردند. برای حصول این امر تامین تمامی شرایط غذایی و محیطی ضروری است. برای این منظور مرحله بندی خوراک مصرفی راهکاری است که کارشناسان برای دستکاری شکمبه پیشنهاد کرده اند.

برای بررسی بهتر نمودار رشد میکروارگانیسمی لازم است علاوه بر موارد اشاره شده، صفاتی همچون زمان مورد نیاز برای تجدید نسل، نرخ رشد ویژه و نرخ ترقیق ارزیابی شوند. زمان مورد نیاز جهت تجدید نسل شامل مدت زمانی است که توده میکروبی جهت دو برابر شدن در محیط شکمبه نیاز به آن دارد. محاسبه این زمان در حالت دینامیک به دلیل تفاوت رشد در گونه های مختلف میکروبی و جذب تولیدات میکروبی بسیار سخت و پیچیده می باشد. صفاتی مانند فشار اسمزی، اسیدیته، غلظت مواد مغذی در دسترس و نوع خوراک مصرفی بیشترین اثر را روی این زمان نهفته خواهد داشت. براساس اطلاعات بدست آمده زمان تجدید نسل برای باکتری ها بیشتر از ۱۴ دقیقه تا کمتر از ۱۲ ساعت است، در حالیکه برای پروتوزوئرها بیشتر از ۱۵ ساعت به طول می انجامد. نرخ ویژه رشد عبارت است از مقدار توده زنده تولیدی که منشاء آن از یک گرم سلول میکروبی در هر ساعت باشد، را گویند. نرخ رشد ویژه از نرخ تولید میکروب ها منهای نرخ مرگ و میر آنها حاصل می شود. ارزش این نرخ مستقیما تحت تاثیر نوع خوراک و عوامل محیطی شکمبه می باشد. هر چقدر این موارد مطلوب تر گردد، نرخ رشد ویژه حداکثری خواهد شد. نرخ رشد ویژه تابع فاز تاخیری، مقدار اولیه باکتری و مواد مغذی می باشد. براساس فرمول ۱-۳ هر چقدر فاز تاخیری کمتر از زمان باشد، مقدار اولیه باکتری به اندازه تابع نمایی (Exponential) افزایش می یابد. و اگر فاز تاخیری بیشتر از زمان گردد، مقدار اولیه توده زنده با مقدار توده زنده افزایش یافته برابر می شود. با این فرمول می توان برای هر ماده مغذی نرخ ویژه رشد میکروبی تعیین کرد.

فرمول ۱-۳:

$$X = X_0 \times e^{\mu (t-L)}$$

$X =$ مقدار توده زنده افزایش یافته

$X_0 =$ مقدار توده زنده اولیه

$\mu =$ ثابت ویژه نرخ رشد باکتری

$t =$ زمان

$L =$ فاز تاخیری

عبور مواد جامد و یا مایع از شکمبه را می توان سرعت ترقیق بیان نمود که نرخ آن به صورت بخشی از حجم مایع یا جامد که شکمبه را در واحد زمانی ترک می نماید، تعریف می شود. این نرخ را می

توان با تزریق یک نشانگر قابل حل ولی غیر قابل هضم مشخص نمود. خوراک های که به آهستگی هضم می شوند، میزان نرخ ترقیق را کاهش می دهند. افزایش این نرخ سبب تغییر نوع تولیدات میکروبی بصورت غیرمستقیم می شود. بطور مثال، افزایش ترقیق سبب کاهش نرخ هضم سلولز شده و بالطبع سبب افزایش نسبت اسید پروپیونیک در اسیدهای چرب فرار می شود. نرخ ترقیق را می توان از فرمول ۲-۳ با کمک نشانگر مشخص نمود. نرخ ترقیق به طور معمول از ۰/۰۳ تا ۰/۱۵ در ساعت برای گوسفندان و تقریبا ۰/۲ در ساعت برای گاوها متغیر می باشد. افزایش نرخ ترقیق سبب عبوری تر شدن مواد غذایی مانند پروتئین ها می شود. کارشناسان بر این باورند جهت ثبات بیشتر تنوع میکروبی ایجاد شده (به صورت تحمیلی یا طبیعی) در شکمبه بایستی نرخ ترقیق برابر یا کمتر از نرخ رشد ویژه باشد. خارج از این حالت سبب شسته شدن میکروب ها از شکمبه و حذف گونه میکروبی می شود.

فرمول ۲-۳: $D_{(\%h^{-1})} = F_{(L\,h^{-1})} \div V_{(L)}$

F=مقدار ماده ایی که از شکمبه عبور می کند

V=حجم محتویات شکمبه

نوع خوراک مصرفی (جدول ۲-۳)، شرایط محیط خارجی دام مانند حرارت، تغییرات فشار اسمزی و اسیدیته محیط شکمبه بطور مستقیم و غیر مستقیم بر نرخ ترقیق اثر می گذارند. خوراک بر پایه علوفه می تواند به دلیل حجیم بودن و فشار بر محتویات شکمبه، افزایش حرکات شکمبه- نگاری (مانند نشخوار) و افزایش ترشحات بزاق نرخ ترقیق را افزایش دهند. همچنین کاهش حرارت سبب افزایش نرخ ترقیق به دلیل افزایش هورمون کاته کولامین در بدن می باشد. این عامل سبب مصرف بیشتر خوراک جهت کسب انرژی بیشتر و همچنین سبب کاهش هضم خوراک به خصوص علوفه در سرما می شود. می توان گفت امروزه بحث درباره رشد میکروارگانیسم ها در سه محور کلی کارآیی میکروبی، توده میکروبی و حرکت یا جریان میکروبی از شکمبه به هزارلا که تحت اثر مستقیم نرخ ترقیق قرار دارد، انجام می گیرد.

جدول ۲-۳ اثر نوع خوراک بر نرخ ترقیق.

ردیف	نوع خوراک	نرخ ترقیق
۱	یونجه خشک	۰/۲۰۶ h^{-1}
۲	دانه	۰/۰۹۶ h^{-1}
۳	مواد متراکم	۰/۰۵۶ h^{-1}
۴	علف باغی خشک	۰/۱۴۳ h^{-1}

بر گرفته از کلارک و پرینز، ۱۹۸۰

کارآیی میکروبی عبارتست از گرم سلول میکروبی خشک شده از هر مول ماده مغذی تخمیر شده و یا هر مول ATP قابل دسترس تولیدی. کارآیی میکروبی همواره با تولیدات میکروبی نسبت عکس دارد. یعنی هر چقدر میزان تولیدات میکروبی ناشی از تخمیر مواد غذایی بیشتر شود، میزان کارآیی میکروب ها کمتر می شود. بطور مثال؛ فرآوری دانه ها مانند جو یا ذرت سبب کاهش تولیدات میکروبی می شود، اما کارآیی میکروب ها را افزایش می دهد. لازم به ذکر است که کارآیی میکروبی به صورت غیرمستقیم بر توده و ترکیب میکروبی اثر بسزایی دارد.

همانطور که قبلا توضیح داده شد، کارآیی میکروبی تحت تاثیر مواد مغذی مورد دسترس میکروب ها، ترکیب و نرخ خوراک مصرفی، الگوی تخمیر و فاکتورهای محیطی می باشد. کارآیی و توده میکروبی را همواره با مقادیر پروتئین و انرژی مورد نیاز میکرارگانیسم ها بحث می کنند. همانند سایر موجودات، میکروارگانیسم ها هم به غیر از زمان تجدید نسل برای حرکت، فعالیت های تغذیه ایی مانند تخریب، تجزیه و ساخت ماده مغذی مورد نیاز خود، بازسازی ارگانلهای درون سلولی، هورمون ها و آنزیم های ترشحی و سایر فعالیت های شناخته شده و ناشناخته خود نیاز به انرژی، پروتئین و سایر مواد مغذی دارند. اما این احتیاجات در هر میکروارگانیسمی متفاوت خواهد بود. این تفاوت سبب تفکیک منحنی های رشدی آنها از یکدیگر شده، اما منحنی رشد هر گونه با منحنی سایر میکروارگانیسم ها مرتبط می باشد. به همین دلیل است که مطالعه دقیق بر روی آنها در شرایط آزمایشگاهی مشکل و گاه دور از ذهن خواهد بود. اما بهترین روش مطالعه جهت تعیین کارآیی میکروبی را می توان ناپدید شدن دسته ای از مواد مغذی را در حین تخمیر در شکمبه از طریق فیستولا گذاری عنوان نمود. در هنگام نمونه برداری از فیستولاهای قرار داده شده بر روی شکمبه دام باید به عوامل پیرامونی آن یعنی دام مورد آزمایش، زمان و روش های برداشت نمونه (زمان برداشت نمونه ها از شکمبه براساس نوع خوراک مصرفی مانند فیبر یا مواد قندی و پروتئینی صورت می گیرد)، جایگاه برداشتن نمونه ها (منطقه ای بین کیسه پشتی و شکمی شکمبه ها به علت تجزیه پذیری کامل تر خوراک در آنجا) و نگهداری و شستشوی کامل نمونه های برداشت شده دقت بسیار نمود.

۳-۳ محل قرارگیری و چگونگی فعالیت میکروارگانیسم ها

محل قرار گیری میکروارگانیسم ها در دستگاه گوارش به شدت وابسته به نوع دام یا تنوع موجودات دارد. محل قرار گیری میکروارگانیسم در دستگاه گوارش بسته به استراتژی هضم و نوع خوراک مصرفی متفاوت است (شکل ۳-۳). این استراتژی تعیین کننده فعالیت های هضمی فیزیکی- شیمیایی

مواد غذایی در دستگاه گوارش و تنوع خوراک مصرفی می باشد. دستگاه گوارش دام می تواند تعیین کننده نوع تخمیر و خصوصیات میکروب های فعال در دستگاه مزبور باشد.

شکل ۳-۳ محل قرار گیری میکروب های تخمیر کننده در دستگاه گوارش. رنگ سیاه حضور صد درصدی میکروب ها و رنگ سفید فقدان میکروب ها را نشان می دهد.

نگهداری میکروارگانیسم ها در جایگاههای مختلف دستگاه گوارش به عوامل متعددی وابسته می باشد. اما محیط شیمیایی دستگاه گوارش، مقدار مواد مغذی در دسترس و سرعت جذب آنها، نرخ عبور و خاصیت تدافعی دستگاه گوارش از مهمترین عوامل ثبات میکروب در دستگاه گوارش بخصوص شکمبه در نشخوارکنندگان و سکوم در تک سمی ها می باشد.

اندازه بزرگ شکمبه در نشخوارکنندگان و نوع حرکات موجود در این دستگاه سبب قرار گیری مناسب خوراک در آن می شود. این نحوه قرار گیری خوراک در شکمبه (شکل ۱-۲) سبب هضم و جذب مطلوب تر و همچنین نشخوار و ترقیق خوراک از شکمبه می گردد. براساس نظریه های ارائه شده می توان برای حضور میکروارگانیسم ها در شکمبه براساس وضعیت قرارگیری خوراک در آنجا استقرار خاصی قائل شد. چهار منطقه جهت استقرار میکروب ها شناسایی که شامل:

۱). میکروب های این بخش در فاز مایع شکمبه قرار می گیرند. در این منطقه تقریبا مواد عبوری و موادی با دانسیته بیشتر قرار گرفته اند. حجم این منطقه براساس نوع خوراک از متوسط تا بزرگ را شامل می شود. به دلیل وجود اسیدهای چرب فرار زیاد در این منطقه و فاکتورهای نامطلوب تر جهت رشد میکروارگانیسم ها، تراکم حضور میکروب ها در آن کم می باشد. بطور تقریبی ۱۵-۱۰ درصد از میکروب های شکمبه در این منطقه زندگی می کنند. مقادیر قند محلول در این بخش کم و میزان مواد مغذی مورد نیاز میکروب ها در کمترین حد خود قرار دارد. اما بیشترین حجم میکروبی زنده مربوط به این بخش پروتوزوئرها می باشد که ۲۵-۲۰ درصد پروتوزوئرهای زنده را تشکیل می دهد. علت آن مربوط به نحوه تغذیه پروتوزوئرهاست که از باکتری های موجود استفاده و آنها را خرد می کنند.

بیشترین گونه باکتری شناسایی شده در این منطقه مربوط به استرپتوکوکوس، مگاسفرا و باکتروئیدها می باشد. از مشخصه های مهم این منطقه تغییر و تحول سریع فعالیت های شکمبه جهت عبور است که تابع تاثیر رفتار حیوان در مصرف خوراک و محیط بیرونی نشخوارکنندگان می باشد. به همین دلیل لازم است جهت حفظ و دوام فعالیت میکروبی در این منطقه، نرخ تجدید نسل کم و نرخ رشد زیادی داشته باشند. در هنگام دستکاری های فلور میکروبی شکمبه بایستی به قرارگیری میکروب مورد نظر اهمیت و مهندسی ژنتیک میکروب را به همان سمت سوق داد. یعنی میکروب هایی که نرخ رشد کمی دارند در صورت قرار گیری در منطقه یک از دست رفته و روند تغییر فلور میکروبی عقیم می ماند.

۲). حضور میکروب ها در این بخش مربوط به فاز جامد شکمبه می باشد. نقش اساسی این منطقه هضم و تجزیه کردن ذرات جامد با وزن مخصوص کم (اندازه ذرات بزرگ) محتویات تشک فیبر شکمبه است. تراکم میکروب های زنده در این منطقه بسیار بالا (۵۰ تا ۶۰ درصد میکروب ها را شامل می گردد) بوده و براساس نوع ماده خوراکی متغیر خواهد بود. حضور پروتوزوئرها در این منطقه بیش از سایر مناطق شکمبه می باشد و در حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد از توده زنده را پروتوزوئرها تشکیل می دهد. میزان شسته شدن میکروارگانیسم ها در این بخش از سایر مناطق به خصوص منطقه یک کمتر است. تراکم میکروب ها در این بخش یکنواخت نبوده و بیشتر مربوط به مواد قابل هضم می باشد. تنوع میکروبی در این بخش بسیار بالا بوده و باکتری های زیادی در آنجا فعال هستند. اما گونه باکتری های فیبرولایتیک در این بخش غالب تر بوده و باکتری های ساکسینوژن، رومینوکوکوس ها و بورولیا فراوان دیده می شوند. از مشخصه های مهم این منطقه فعالیت بافری بالا به دلیل بازگشت خوراک از این ناحیه به دهان و آغشته شدن با بزاق نشخوارکنندگان می باشد. به دلیل حضور بالای مواد مغذی قابل دسترس در این منطقه نرخ رشد میکروب ها در مقابل نرخ تجدید نسل آنها کمتر بوده و این یک مزیت در تداوم حیات میکروبی در شکمبه محسوب می شود. در این منطقه اثرات دو جنبه ای میکروبی هم زیاد دیده می شود. لذا در هنگام تغییر فلور میکروبی و قرارگیری میکروب ها در این منطقه لازم است به نرخ تجدید نسل بالا در انجا و اثرات دو جنبه ای توجه زیادی نمود. تغییرات محیطی شکمبه مانند اسیدیته و فشار اسمزی در این منطقه با نوسانات کمتری روبرو بوده است. علت آن هم مربوط به خاصیت فیزیکی شیمیایی خوراک های فیبری حاضر در این منطقه می باشد.

۳). میکروب ها در این بخش بین فاز جامد و مایع بر روی مواد جامد با وزن مخصوص متوسط (اندازه متوسط) در حال فعالیت و تجزیه و هضم بیشتر می باشند. تبادلات غذایی در این مرحله بسیار بالا و تخمیر در این منطقه به شدت در حال انجام می باشد. تراکم میکروب ها در این منطقه یکنواخت تر از سایر بخش ها بوده و بین ۳۰ تا ۴۰ درصد از توده زنده میکروبی را براساس نوع خوراک مصرفی تشکیل

می دهد. ارتباطات میکروبی و اثرات متقابل آنها در این منطقه پیچیده و شبیه سازی آن تقریبا غیرممکن می باشد. می توان گفت این منطقه مسئول انتقال میکروب ها را به فاز مایع داشته و انتقال دهنده تولیدات نهایی میکروارگانیسم ها را به عهده دارد. به دلیل حضور مواد مغذی فراوان حل شده در کنار تولیدات میکروبی نرخ رشد و نرخ تجدید نسل در آنها تقریبا برابر بوده و امکان تداوم حیات و فعالیت میکروبی منوط به نوع ماده مغذی رسیده دارد. بطور مثال؛ استفاده از سیلوها سبب ازدیاد تولیدات تخمیری در این منطقه شده و میکروب ها را به نرخ رشد بیشتر و تجدید نسل کمتر هدایت می کند. به دلیل حضور قندهای محلول فراوان و نیتروژن آزاد شده در این منطقه تعادل این بخش به راحتی متغیر شده و از حالت عادی می تواند خارج شود. تولید نفخ از مهمترین مشخصه این منطقه می باشد. ۳۰ تا ۴۰ درصد از پروتوزوئرهای شکمبه در این منطقه زندگی می کنند. باکتری های غالب در این منطقه متنوع و آلبوس ها، ویبریوها و سپیراها نمونه آنها محسوب می شود. هنگام تغییر فلور میکروبی شکمبه باید به فعالیت اصلی میکروب ها در این منطقه که حد واسط تجزیه و تخمیر می باشند توجه اساسی کرد. نرخ شسته شدن در این بخش تقریبا رو به افزایش بوده و فاکتورهای محیطی شکمبه دائما در حال نوسان می باشد.

۴). حضور میکروب ها در این منطقه بسیار حیاتی بوده و در اثر شسته شدن نابجا بر اثر مصرف خوراک های سمی و یا به شدت مایع می تواند صدمات سختی را به فلور میکروبی شکمبه وارد نماید. این بخش از قرارگیری، امکان پیوند بافت اکسیژن دار دیواره شکمبه را به یک محیط عاری از اکسیژن بوجود می آورد. میکروب های این بخش به صورت اختیاری هوازی بوده و اکسیژن محیط شکمبه را مصرف تا محیط برای سایر میکروارگانیسم ها مساعد شود. اکسیژن یک سم بالقوه در محیط شکمبه برای فعالیت های تخمیری محسوب می شود. اگر چه میکروب های این بخش بیش از یک درصد از توده زنده میکروبی را تشکیل نمی دهند، اما حذف اکسیژن و فعالیت های تجزیه اوره را که اهمیت شدیدی برای محیط شکمبه و رشد میکروبی دارند، به عهده گرفته اند. این میکروب ها همانند یک مسواک به کمک دیواره سلولی شکمبه رفته و به حذف سلول های مرده پرداخته و سرعت جذب اسیدهای چرب فرار و آمونیاک اضافی را برای مطلوب شدن محیط شکمبه بیشتر می کنند. باکتری هایی مانند فوزوباکتریوم ها و کوکوس ها از این دسته میکروب ها محسوب می شوند. در تغییرات فلور میکروبی شکمبه همواره کنترل این بخش ضروری بوده است. اما تغییرات میکروبی این بخش هرگز مدنظر نبوده و تغییرات ایجاد شده در سایر بخش ها که با این منطقه هماهنگ است، مورد نظر می باشد.

۳-۳-۱ چگونگی فعالیت میکروارگانیسم ها

صرفه نظر از مساعد بودن فاکتورهای محیطی شکمبه، عواملی وجود دارند که بر فعالیت مطلوب میکروارگانیسم ها اثر بسزایی دارند. این عوامل می تواند به نوع ماده خوراکی و فعالیت میکروبی تقسیم شوند. نوع ماده خوراکی می تواند میزان فعالیت میکروارگانیسم ها را براساس میزان تجزیه پذیری خوراک، اندازه ذرات، میزان تبادلات کاتیونی، قدرت جذب و نگهداری آب و وزن مخصوص تحت تاثیر قرار دهد.

- همواره تراکم میکروب ها بر روی موادی که قدرت تجزیه پذیری کمتری دارند، کم می باشد. از آنجا که نوع تجزیه پذیری مواد سبب قرارگیری خوراک در مناطق مختلف هضمی شکمبه می شود، بالطبع میزان تجزیه پذیری مواد بر نرخ رشد، تجدید نسل و فعالیت میکروارگانیسم ها اثر بسزایی خواهد داشت. بطور مثال؛ افزایش تجزیه پذیری مواد می تواند میزان نرخ رشد را کاهش و تجدید نسل میکروارگانیسم ها را افزایش دهد (البته در مباحث ارائه شده تعادل مواد مغذی مورد نیاز میکروب ها همواره در اولویت قرار دارد).
- اندازه ذرات هم براساس مفاهیم ارائه شده در فصل دوم می تواند اثر مهمی در فعالیت میکروبی داشته باشد. هر چقدر اندازه ذرات بیشتر شود، میزان فعالیت میکروارگانیسم ها در واحد زمان بر روی هر گرم ماده خشک کمتر خواهد شد. از طرفی، کاهش بیش از اندازه طول ذرات هم سبب عبوری شدن خوراک و کاهش نرخ رشد میکروب ها در شکمبه خواهد شد.
- قدرت تبادلات کاتیونی (جذب آنیون های معدنی و جایگزینی آن با یون هیدروژن را ظرفیت تبادل کاتیونی گویند) که تابع خاصیت فیزیکی-شیمیایی خوراک می باشد در میزان فعالیت میکروارگانیسم ها نقش حیاتی بازی می کند. این خاصیت علاوه بر کنترل اسیدیته شکمبه می تواند سبب اتصال شیره های گوارشی و آنزیمی میکروارگانیسم ها به دیواره سلولی مانند پکتین ها، همی سلولز، لیگنین و سلولز شود. از آنجا که ظرفیت تبادل کاتیونی لگوم ها به دلیل حضور پکتین و سلولز بالاتر از گرامینه ها است، لذا میزان اتصال و فعالیت میکروبی بر روی آنها بیشتر و با دوام تر می باشد. نهایتا شروع نقطه تجزیه پذیری و فعالیت میکروبی به انجام تبادلات کاتیونی ماده مغذی با دیواره سلولی میکروب ها وابسته است.
- قدرت نگهداری آب، همچون تبادلات کاتیونی بر روی فعالیت میکروب ها اثر مهمی می گذارد. قدرت نگهداری آب عبارتست از میلی لیتر آب جذب شده یا نگهداری شده در هر ۱۰۰ گرم ماده خشک می باشد که با تبادلات کاتیونی-آنیونی ارتباط مستقیم دارد. این صفت هم تابع خاصیت فیزیکی-شیمیایی خوراک بوده و سبب افزایش شناوری و معلقی ذرات غذایی شده و فعالیت میکروبی را با نفوذ پذیری بیشتر آنزیم های آنها تشدید می کند. کوچک شدن ذرات به دلیل

سطح تماس بیشتر و کاهش فضای داخلی سبب کاهش ظرفیت آبگیری شده و خوراک را عبوری تر و فعالیت میکروارگانیسمی را کمتر می کند.

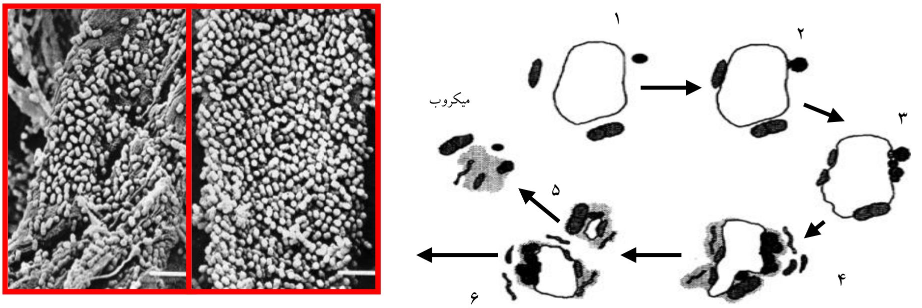
- وزن مخصوص عبارتنداز وزن واحد حجم هر ذره ای که آن را براساس غوطه وری در آب می سنجند. این فاکتور عکس اندازه ذرات غذایی در شکمبه عمل می کند. با افزایش اندازه ذرات، وزن مخصوص کاهش می یابد. از آنجا که نیروهای مختلفی مانند نیروی هیدرولیک مایع شکمبه، گازهای معلق و نیروی ثقلی ذره بر وزن مخصوص اثر می گذارند، شبیه سازی این عامل در آزمایشگاه کمی پیچیده و مشکل می باشد. مجموع نیروهای ذکر شده همراه با وزن مخصوص سبب رسوب گذاری و عبوری شدن مواد غذایی و کاهش فعالیت های میکروبی شکمبه می شود. هر چقدر وزن مخصوص بیشتر شود، امکان فعالیت میکروارگانیسمی به روی ماده مغذی بیشتر می گردد. اما افزایش این وزن از ۱/۴ گرم بر سانتی متر مکعب سبب کاهش کارآیی میکروبی می شود.

۳-۳-۱-۱ اتصال به مواد مغذی

بررسی های اخیر نشان می دهد که اتصال میکروارگانیسم ها به ذرات غذایی مهمترین عامل فعالیت آنها در شکمبه می باشد. زمان اتصال میکروب ها به مواد غذایی از مباحث اصلی کارشناسان در امور فعالیت میکروبی شکمبه می باشد. اتصال میکروارگانیسم ها به طور متوسط در محیط خارج از شکمبه وقت گیر (بیش از ۳۰ دقیقه) و با صرف هزینه زیاد صورت می گیرد. در حالیکه این روند در شکمبه با کمترین هزینه و با سرعت بالاتری (کمتر از ۱۵ دقیقه) صورت می گیرد. البته لازم به ذکر است که زمان اتصال بین گونه های مختلف میکروارگانیسمی حتی بین گونه های یک گروه که عمل مشابهی دارند، متفاوت می باشد. مثلا اتصال باکتری های گروه سلولایتیک مانند *Fibrobacter succinogenes* به سلولز گیاهی در مقابل باکتری *Ruminococcus flavefaciens* که هم گروه هستند، سریعتر انجام می گیرد. اتصال یک میکروارگانیسم به ماده غذایی به فاصله ماده مغذی تا میکروب مورد نظر وابسته است. لذا هر چقدر فاصله ذره غذایی و باکتری کمتر باشد، امکان اتصال آنها بیشتر می گردد. و هر چه تراکم اتصال میکروب ها به ماده غذایی بیشتر گردد، سرعت تجزیه و تخمیر مواد غذایی بالاتر می شود. سرعت اتصال به ساختارهای دیواره سلولی میکروب ها یعنی به پهنای گلایکوکالیکس آنها وابسته است که از چربی، پروتئین و کربوهیدرات تشکیل شده است. فعالیت میکروب ها جهت اتصال به مواد مغذی بصورت ائتلافی و روندی دائمی می باشد. این ائتلاف که بنام جمعیت میکروبی معروف است اساسی ترین محور اتصال به ذرات غذایی محسوب می شود (شکل ۴-۳). بر همین اساس دسته ای از محققین میکروارگانیسم ها را به سه دسته (۱) میکروب هایی که به صورت آزادانه در شکمبه زیست می کنند و

به سطح ماده مغذی نمی چسبند، (۲) میکروارگانیسم هایی که به مواد غذایی حمله و به آنها می چسبند و (۳) میکروب هایی که به دیواره شکمبه می چسبند، تقسیم می کنند. می توان گفت میکروارگانیسم هایی که به صورت آزاد در شکمبه قرار گرفته اند، بیشتر پروتوزوئرها و در حد کمتر باکتری های آزاد، قارچ ها و سایر میکروارگانیسم ها مانند باکتریوخوارها می باشند. پروتوزوئرها میکروب هایی آزادی هستند که با حمله به باکتری های چسبیده به ذرات غذایی آنها را خرد و سبب ترن آور بیشتر مواد مغذی در شکمبه می شود.

محققین یکی از راه حل های افزایش تماس فلور میکروبی شکمبه به اقلام خوراکی را فرآوری آنها جهت دسترسی مطلوب و سریع تر به مواد مغذی می دانند. فرآوری می تواند به صورت فیزیکی (مانند خرد کردن اقلام به اندازه های تعیین شده و یا شکستن دیواره سلولی توسط غلطک زدن جهت آزاد سازی مواد مغذی) و شیمیایی (مانند استفاده از هیدروکسیدسدیم و آمونیاک جهت خرد کردن مواد غیر قابل هضم مانند لیگنین و افزایش دسترسی به عناصر غذایی) انجام گیرد. فرآوری شیمیایی در عمل با مشکلاتی روبرو بوده و سبب تغییر نامطلوب فلور میکروبی شکمبه می شود.



شکل ٤-۳ چگونگی اتصال باکتری ها به مواد غذایی در سمت راست، (۱) میکروب ها بصورت تصادفی و یا براساس نیاز شیمیایی به ذرات غذایی متصل می شوند، (۲) میکروب ها توسط باندهای پروتئینی و گلایکوکالیکس به ذرات می چسبند، (۳) میکروارگانیسم ها با تکثیر ازدیاد یافته و با ایجاد گودال گوارشی در سطح ذرات غذایی فعالیت خود را گسترده می کنند، (٤) کلونی جدید میکروبی به ذرات اضافه و با یک ائتلاف تجزیه پذیری را سریعتر انجام می دهند، (٥) قسمتی از کلونی میکروبی از ذرات جدا و روند را تکرار می کنند و (٦) قسمت باقیمانده در ادامه تجزیه تر شده و از شکمبه عبور می کنند. (منبع McAllister و همکاران 1994).

۲-۱-۳-۳ فعالیت های گروهی میکروارگانیسم ها

دومین عامل مورد بحث در فعالیت های میکروارگانیسمی، فعالیت های گروهی میکروب ها در شکمبه می باشد. در محیط های آزمایشگاهی بررسی و کنکاش درباره میکروب ها به صورت کشت های انفرادی بوده است. این در حالی است که فعالیت میکروارگانیسم ها در شکمبه گاه به صورت رقابتی، شکاری، مشارکتی یک یا دو طرفه، خنثی سازی و اثرات انگلی یا بیماری زایی می باشد. از آنجا

که تنوع میکروبی از یک دام به دام دیگر متفاوت می باشد، شناسایی کامل رفتارهای میکروبی در شکمبه امکان پذیر نمی باشد. اما رفتارهای اشاره شده در دو قالب اساسی یعنی ارتباط میکروب ها با هم نوع خود مانند باکتری با باکتری و ارتباط میکروارگانیسم ها با سایر گونه های میکروبی دیگر مانند باکتری با پروتوزوئرها بررسی می شوند.

فعالیت های مشارکتی همواره جهت رفع مشکل و یا حفظ بقای میکروارگانیسم ها انجام می گیرد. رابط مشارکتی در بین میکروب ها گاهی الزامی و گاه غیر الزامی دیده می شود. بطور مثال؛ در اثر افزایش فعالیت باکتری های سلولایتیک هیدروژن اضافی تولید و در محیط شکمبه انباشته می گردد. هیدروژن اضافی می تواند محدودیت رشدی برای میکروب ها، حتی خود باکتری های سلولایتیک ایجاد کند. باکتری های تولید کننده متان می توانند با فعالیت در کنار باکتری های سلولایتیک هیدروژن اضافی را کاهش دهند (جدول ۳-۳). این ارتباط می تواند هم به فعالیت مشارکتی الزامی و هم به فعالیت خنثی سازی تعریف گردد. و یا در فعالیت های صرفا خنثی سازی باکتری *Megasphaera elsdenii* با مصرف اسیدلاکتیک تولید شده در اثر ورود زیادی قندهای محلول در شکمبه، محیط را (اسیدیته و فشار اسمزی شکمبه) برای سایر میکروب ها مطلوب نماید. گاه فعالیت مشارکتی به صورت یک طرفه ولی غیر انگلی جهت ادامه حیات گروه دیگری از میکروارگانیسم ها صورت می گیرد. بطور مثال؛ در اثر فقدان فعالیت باکتری *Treponema bryantii* فعالیت سلولایتیک باکتری *F. succinogenes* در روی سلولز کاه ها متوقف خواهد شد. و یا در هنگام فعالیت تخمیری نشاسته، باکتری *Succinimonas amylolytique* تولید سوکسینات می کند که ماده حاصل جهت تولید پروپیونات در شکمبه به مصرف باکتری های *M. elsdenii* و *Propionibacterium* قرار می گیرد.

جدول ۳-۳ فعالیت مشارکتی باکتری های *R. flavefaciens* و *M. ruminatium*.

ردیف	تولیدات	مول به ازای هر ۱۰۰ مول هگزوز: *R. flavefaciens*	مول به ازای هر ۱۰۰ مول هگزوز: *R. flavefaciens* *M. ruminatium*
۱	هیدروژن	۳۳	۰
۲	متان	۰	۶۳
۳	گازکربنیک	۳۷	۷۹

اقتباس از کالین، ۱۹۷۵

از مشارکت های دو جانبه دیگر فعالیت باکتری های *B. succinogenes*، *R. flavefaciens* و *Ruminococcus albus* می باشد که محرک رشد گروهی از باکتری ها مانند باکتری *Bacteroides ruminicola* هستند. این باکتری دارای ظرفیت آمین زدایی اسیدهای آمینه شاخه دار و تشکیل

ایزواسیدها می باشد. البته لازم به ذکر است این ایزواسیدها مانند اسید ایزوبوتیریک خود محرک سایر باکتری های سلولایتیک و حتی *R. albus* می باشند.

فعالیت های همزیستی هم از دسته روابطی است که بین میکروب های شکمبه دیده می شود. بطور مثال؛ رابطه بین قارچ ها و پروتوزوئرها فعالیت همزیستی بوده که بین دو گونه کاملا متفاوت میکروارگانیسمی اتفاق افتاده است. از دیگر فعالیت های همزیستی بین دو گونه کاملا متفاوت می توان به همزیستی کامل مایکوپلاسماها با قارچ ها اشاره نمود که اینگونه روابط بایستی در تغییرات فلور میکروبی شکمبه به شدت مورد توجه قرار گیرند. این گونه روابط می تواند در جهت حذف یک ماده سمی و یا تهیه یک ماده مغذی مورد نیاز برای طرفین باشد که در صورت حذف یکی از طرفین، رشد گونه بعدی با نقص همراه خواهد بود.

فعالیت شکاری از جمله فعالیت های میکروبی است که بیشتر بین گونه های متفاوت میکروارگانیسمی شکمبه اتفاق می افتد. بطور مثال؛ عدم حضور گروه های باکتریایی سبب شسته شدن و یا کاهش تراکم گروهی از پروتوزوئرها از محیط شکمبه خواهد شد. این روند نشان می دهد ماده اولیه مورد نیاز رشد پروتوزوئرها از شکار باکتری ها حاصل می شود. و یا فعالیت بین باکتریوخوارها با باکتری ها همیشه شکاری بوده است. فعالیت های شکاری سبب ترن آور مواد مغذی شکمبه و افزایش فعالیت های میکروبی و توده آنها می شود. اما علاوه بر فعالیت شکاری، فعالیت های خنثی سازی را هم بین گونه های متفاوت میکروارگانیسمی می توان دید. فعالیت قارچ ها در کنار سایر میکروارگانیسم ها از این دسته موارد محسوب می شود. قارچ ها علاوه بر تجزیه بعضی از مواد غیر قابل هضم، می توانند اکسیژن اضافی را که ماده سمی برای میکروب های غیر هوازی محسوب می گردد را از محیط شکمبه خارج نمایند. این مستندات گواه بر آن است که فعالیت مشارکتی، رقابتی، شکاری و خنثی سازی سبب حفظ و بقای فعالیت گونه های میکروبی خواهد شد. اما آزمایشات مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ های الکترونی نشان داده است که فعالیت میکروب ها همواره به صورت فوق نبوده و گاهی در رقابت با یکدیگر فعالیت می کنند. رقابت بدین صورت است که غذا به مصرف یک میکروارگانیسم خاص رسیده و برای غلبه یافتن این گونه بر سایر گونه های میکروبی جهت مصرف بیشتر مواد مغذی، موادی از خود ترشح که محیط را جهت فعالیت خود سوق می دهند. بطور مثال؛ باکتری های آمیلولایتیک جهت رسیدن به بیشترین رشد، از قندهای محلول در شکمبه بیشتر و سریعتر استفاده می نمایند. سپس این میکروب ها برای کاهش فعالیت سایر باکتری ها مانند گونه سلولایتیک، اسیدلاکتیک و پروپیونیک اضافی جهت بالا بردن اسیدیته شکمبه تولید می کنند. و یا افزایش مواد غذایی ساپونین دار فعالیت میکروب ها را به دلیل فعالیت و رشد بالای گروه های متان زا و تشکیل نفخ متوقف می نماید. اثرات

تقابلی آگاهانه به ندرت و براساس حضور یک گونه جدید میکروبی و یا با ورود یک ماده غذایی سم زا اتفاق می افتد. حضور پاتوژن ها هم می تواند بر اثرات تقابلی آگاهانه و حتی انگلی اثر مثبت داشته باشند. مهمترین مثال در این زمینه توقف فعالیت *E.coli* در شکمبه به دلیل تجمع اسیدلاکتیک در آن می باشد. البته فعالیت های میکروب های غیرهوازی می تواند فعالیت هوازی سایر میکروارگانیسم ها را متوقف نماید.

لازم به ذکر است که اثرات رفتاری یاد شده میکروب ها می تواند براساس تولیدات میانی و یا نهایی انباشته شده مانند اسیدهای چرب فرار، غالب های نیتروژنی، الکل ها، فورمات و هیدروژن باشد (شکل ۵-۳). اثرات فوق بیشتر به صورت ناخواسته و به دلیل نوع ماده غذایی مصرف شده در شکمبه بوجود می آید. اما در دستکاری میکروفلور شکمبه توسط خوراک مصرفی باید به روابط میکروارگانیسم ها دقت نمود تا علاوه بر افزایش تولیدات تخمیری و بهبود ضرایب جذبی مواد مغذی، از شسته شدن و یا حذف گونه های میکروارگانیسمی جلوگیری کرد.

پروتئین

Bacteria: *B. fibrisolvens, E. ruminantium, Fusobacterium* spp., *L. multipara, Prevotella* spp., *R. amylophilus, S. ruminantium, Str. bovis.*
Protozoa: *E. caudatum, E. caudatumecaudatum, E. ruminantium, E. maggii, E. medium, O. caudatus, P. multivesiculatum, O. joyonii, D. ruminantium,*
Fungi: *N. frontalis, P. communis*

الیگوپپتیدها

Bacteria: *S. bovis, R. amylophilus, Prevotella spp.,*

دی پپتیدها

Bacteria: *F. succinogenes, M. elsdenii, Prevotella spp., L. multipara, S. ruminantium.*
Protozoa: *Isotricha* spp., *E. caudatum, D. ruminantium*

اسیدهای آمینه

Bacteria: *B. fibrisolvens, Prevotella spp., M. elsdenii, S. ruminantium.*

آمونیاک

شکل ۵-۳ ردیف های عرضی نمایانگر روابط مشارکتی دو طرفه و رقابتی و ردیف های طولی نمایانگر روابط خنثی سازی و مشارکتی دو طرفه می باشد.

۲-۳-۳ تراکم و گسترش جمعیت میکروبی

از فاکتورهای بسیار موثر بر فعالیت های میکروارگانیسمی، تراکم و تنوع میکروب ها در شکمبه می باشد که می تواند تحت تاثیر مستقیم عوامل خوراکی مانندکمیت و کیفیت خوراک مصرفی، عوامل حیوانی مانند سن، سلامتی دام و تفاوت های ژنتیکی دامی و عوامل محیطی مانند فصل و شرایط آب و هوایی قرار گیرد. حضور، قدرت حرکت و تنوع میکروارگانیسم ها در شکمبه می تواند اثر بسزایی در

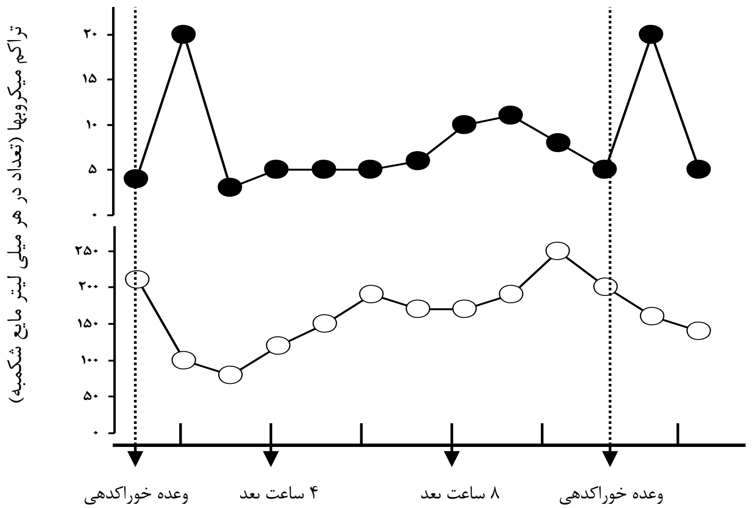
فعالیت تخمیری آنها داشته باشد. تراکم بیش از اندازه یک گونه و عدم تعادل بین میکروب ها می تواند بر سایر گونه ها اثر منفی یا مثبت ایجاد نماید. تراکم های مناسب میکروبی می تواند توان هضمی- گوارشی شکمبه را افزایش داده و سبب ارتقای تولیدات تخمیری و سرعت هضم و جذب مواد مغذی شود.

۱-۲-۳-۳ عوامل خوراکی موثر بر جمعیت میکروبی

محققین کمیت و کیفیت خوراک مصرفی را از مهمترین فاکتورهای موثر بر تراکم و تنوعات میکروبی می دانند. نوسانات پی در پی تعداد و نوع میکروارگانیسم ها قبل و بعد از خوراک دهی ادعای مذکور را اثبات می نماید. کیفیت خوراک مصرفی می تواند براساس تغییرات اسیدیته شکمبه، فشار اسمزی، میزان تجزیه پذیری مواد مغذی مورد دسترس، ظرفیت تبادل کاتیونی جهت اتصال میکروب ها و سایر خصوصیات فیزیکی- شیمیایی بر تراکم میکروارگانیسم ها اثر بگذارد. کمیت خوراک مصرفی (سطح مصرف) هم براساس نرخ عبور که وابسته به میزان مصرف، شکل خوراک مصرفی و نوع فرآوری خوراک می باشد، می تواند با افزایش مدت زمان ماندگاری غذا در شکمبه بر جمعیت میکروبی موثر واقع شود. بطور مثال؛ زمانی که بره ها در سطح نگهداری تغذیه شدند تعداد باکتری ها $۹۲/۸ \times ۱۰^{۸}$ به ازای هر گرم محتویات شکمبه و زمانی که ۱/۸ برابر نیاز نگهداری تغذیه شدند تعداد باکتری ها به $۱۱۵/۰ \times ۱۰^{۸}$ به ازای هر گرم محتویات شکمبه افزایش یافت. دفعات خوراک دهی همانند سطح مصرف بر جمعیت میکروبی اثر بسزایی دارد. تحقیقات نشان می دهد افزایش تعداد دفعات خوراک دهی از ۲ به ۴ بار در روز تاثیر معنی داری بر جمعیت پروتوزوئرها و تاثیر اندکی بر باکتری ها داشته است. با افزایش کیفیت خوراک مصرفی تراکم حضور میکروب ها بیشتر می شود، اما تنوع میکروبی در حد کمتری تحت تاثیر قرار می گیرد. همچنین اطلاعات اخیر نشان داده است که افزایش محلولیت خوراک هم سبب دسترسی بیشتر مواد مغذی و در نتیجه افزایش جمعیت میکروبی می گردد. استفاده از خوراک های حاوی مواد متراکم مانند کنسانتره ها در مقابل مواد علوفه ای می تواند ازدیاد میکروب ها را شامل گردد. دلیل اصلی این تراکم در دسترس بودن انرژی کافی برای رشد و تجدید نسل میکروب ها می باشد. از طرف دیگر، افزایش جمعیت میکروبی فرآیند تخمیر را بهبود بخشیده و مقدار توده میکروبی تولید شده را بیشتر خواهد کرد. روند اثر خوراک بر تراکم جمعیت میکروبی زمانی قابل تعمیم و قیاس در همه موجودات می باشد که دفعات تغذیه، زمان نمونه گیری، نسبت های مواد خوراکی و مغذی مانند نسبت مواد متراکم به علوفه و یا انرژی به پروتئین در همه دام ها تصحیح شده باشد. زمانی یک خوراک می تواند تنوع میکروبی را گسترش دهد و یا گونه جدیدی را احیا نماید که خوراک کاملا جدیدی براساس تغییرات محل زندگی و یا تغییر منابع تامین خوراک وارد شکمبه

گردد. لازم به ذکر است که استفاده از جیره های پر علوفه می تواند تنوعات میکروبی را افزایش دهد. این تنوع میکروبی در جهت ایجاد محیط مطلوب تر شکمبه برای فعالیت های بعدی میکروارگانیسمی می باشد. بطور مثال؛ استفاده از جیره های غنی از مواد متراکم و یا کربوهیدرات محلول در مقابل جیره غنی از علوفه، می توان تراکم تک یاخته ها بخصوص هلوتریش ها را افزایش داد. اما وقتی مصرف مواد متراکم به صورت آزاد و مصرف علوفه ها به حد صفر تنزل پیدا کند، جمعیت تک یاخته ها به طور کل ناپدید می شود. این عامل می تواند ناشی از فقدان کربوهیدرات های ساختاری موجود در علوفه و یا تنزل شدید pH باشد. و یا با مصرف علوفه می توان تراکم قارچ های بی هوازی را که خرد کنندگان لیگنین محسوب می شوند را در کنار سایر میکروب ها در شکمبه افزایش داد. نهایتا تنوع میکروارگانیسمی شدیدا وابسته به حضور مواد علوفه ای و نسبت آن در شکمبه وابسته می باشد.

بررسی تغییرات شبانه روزی تعداد کل میکروارگانیسم های شکمبه با مصرف جیره های مختلف نشان داده است که تا حدود چهار ساعت پس از مصرف خوراک، تراکم باکتری های شکمبه مانند کوکسی ها کاهش یافته و سپس شروع به ازدیاد می نماید و تا هنگام مصرف وعده بعدی خوراک این روند افزایشی همچنان ادامه خواهد داشت (شکل۶-۳).



شکل ٦-۳ تراکم میکروارگانیسم ها قبل و بعد از خوراکدهی. دایره های سفید تراکم باکتری های کوکسی و دایره های سیاه رنگ تراکم هلوتریش ها را نشان می دهد.

به دنبال مصرف وعده بعدی خوراک مجددا کاهش در تراکم باکتری ها مشاهده شده و پس از چهار ساعت افزایش تدریجی جمعیت میکروارگانیسم ها آغاز می شود. البته لازم به ذکر است که تمامی گونه های میکروارگانیسمی از این روند تبعیت ننموده و هلوتریش ها برعکس سایر میکروب ها با

مصرف هر وعده خوراکی، افزایش و با گذشت زمان کاهش می یابند. تغییرات تراکم و تنوع میکروب ها در شکمبه براساس زمان مصرف خوراک بیشتر تابع اسیدی شدن محیط شکمبه ناشی از ازدحام هیدروژن و اسیدهای چرب فرار پروپیونات و لاکتات می باشد. تراکم هیدروژن و اسیدهای چرب فرار ناشی از تخمیر سریع و ناگهانی کربوهیدرات های محلول در خوراک اتفاق می افتد. اما، با گذشت زمان و جذب اسیدهای چرب فرار همراه با فرار هیدروژن توسط فعالیت باکتری های متان زا و ترشح ترکیبات بافری از بزاق و دیواره شکمبه اسیدیته شکمبه به حالت مطلوب رسیده (pH = ۵/۸ – ۷) و با تجزیه آهسته کربوهیدرات های ساختاری فعالیت میکروارگانیسم ها و تنوعات آن بیشتر می شود.

۲-۲-۳-۳ عوامل دامی و محیطی موثر بر جمعیت میکروبی

بررسی ها نشان می دهد تعداد جمعیت میکروبی و تنوعات آن سبب ایجاد توان هضمی بین نشخوارکنندگان می گردد. توان هضمی ناشی از فلور میکروبی بین زیر راسته نشخوارکنندگان مانند گوزن سانان، گاوسانان، شترسانان، آهوسانان و دیگر نشخوارکنندگان تفاوت معنی داری دارد. این تفاوت حتی بین جنس ها و گونه های هر یک از موارد اشاره شده مانند بوس تاروس ها (*Bos taurus*) و بوس ایندیکوس ها (*Bos indicus*) در گاوها دیده می شود.

تفاوت اشاره شده در توان هضمی حتی بین جنسیت های نر و ماده نشخوارکنندگان بررسی شده است. مهمترین عامل موثر در این تفاوت ها را تغییر شرایط فیزیولوژیکی نشخوارکنندگان مانند تغییر وزن و ظرفیت گنجایش شکمبه عنوان نموده اند. مثلا در نشخوارکنندگانی که به دلایل آبستنی و یا تغییرات قد و اندازه دارای شکمبه و نگاری کوچکتری در مقابل سایر نشخوارکنندگان شده اند، می توان تراکم و تنوع بیشتری از میکروب ها را در آنها مشاهده کرد. علت این تفاوت را کارشناسان به نرخ عبور مواد غذایی از شکمبه که به گنجایش شکمبه و نگاری وابسته است، مرتبط دانسته اند. البته کارشناسان بیشترین عامل در تفاوت میکروارگانیسم های شکمبه را موقعیت جغرافیایی دام می دانند که انعکاسی از جیره حیوان، منشاء و یا خاستگاه حیوان و ایزوله بودن آن از سایر نشخوارکنندگان می باشد. تغییراتی که دام در تراکم و تنوع گونه میکروبی شکمبه خود ایجاد می کند، بیشتر جهت کسب مواد تخمیری مورد نیاز و سپس برای کنترل مواد ضد مغذی مصرف شده می باشد. به همین دلیل است که در یک منطقه جغرافیای خاص با تنوع گیاهی یکسان و در نژادهای مشابه دامی تفاوت هایی در تراکم و تنوع میکروبی دیده می شود.

علاوه بر عوامل دامی موثر بر فعالیت های میکروارگانیسمی، محیط هم از طریق تغییرات فصل، آب و خاک بر تعداد و تنوع میکروب ها اثر بسزایی خواهد داشت. فصل براساس تغییرات دمای محیط، شدت تابش نور و رطوبت بر کیفیت و کمیت خوراک اثر مسنقیم دارد. لذا، محیط و تغییرات مداوم آن

به طور غیرمستقیم از طریق خوراک بر فعالیت های میکروبی تاثیر می گذارد. بطور مثال؛ تعداد باکتری های شکمبه گاوها و گوسفندان در فصل زمستان نسبت به تابستان تراکم کمتری داشته است (بترتیب و به طور تقریبی ۵۲ و ۵۱ بیلیون باکتری در هر گرم از محتویات شکمبه در مقابل ۹۶ و ۸۵ بیلیون باکتری)، که می تواند ناشی از فقر انرژی کسب شده از طریق مصرف علوفه های مرتعی در زمستان باشد. تاثیرات محیطی تنها به فصل بسنده نمی شود. عواملی مانند گیاه آغشته به خاک و استفاده از آب سرد و یا آبی که دارای سختی زیاد باشد، می تواند فلور میکروبی شکمبه را دچار تنش نموده و ناخودآگاه آن را تغییر دهد. نوع خاک منطقه و عناصر معدنی موجود در آن می توانند اثر مستقیم بر فعالیت های میکروبی شکمبه داشته باشند. خاک های حاوی نیترات و فسفات بیشترین اثر را از طریق تغییرات محیط شکمبه بر تراکم و تنوع میکروبی داشته اند. استفاده از آب سرد در کوهستان ها و یا مراکز دامی با مدیریت ضعیف می تواند به دلیل کاهش فعالیت میکروارگانیسمی سبب کاهش تنوع و تراکم میکروبی گردد. همچنین استفاده از آبی که سختی نامشخصی دارد، مانند آب چشمه ها می تواند با تغییر بار الکتریکی محتویات شکمبه و تغییر پتانسیل احیا (۳۵۰- میلی وات) میزان جذب آب و قدرت تجزیه پذیری مواد مغذی، فشار اسمزی و ظرفیت بافری محیط شکمبه و یا جذب مواد مغذی توسط میکروارگانیسم ها را تغییر و تنوع و تراکم میکروب ها را براساس تغییرات فعالیت های تخمیری دگرگون سازد.

۳-۲-۳-۳ تاسیس و توسعه میکروارگانیسم ها در شکمبه

بررسی ها نشان می دهد که توسعه جمعیت میکروارگانیسمی در دام های تازه از شیر گرفته شده و بالغین به عامل مدیریتی وابسته می باشد. مدیریت زمان های تغذیه، کمیت و کیفیت خوراک مصرفی همراه با مدیریت نگهداری دام در مرتع و یا جایگاه از مهمترین علل های توسعه میکروارگانیسمی محسوب می شود. در هنگام بررسی توسعه تراکم و تنوع میکروبی در شکمبه باید علاوه بر جیره و منشاء آن به جنسیت میزبان، سن، گونه نشخوارکننده و احتیاجات خاص آنها، قابلیت دسترسی به میکروب ها، فعالیت های گروهی دام ها در مرتع یا جایگاه نگهداری (میکروب هایی مانند پروتوزوئرهای مژک دار و یا قارچ ها می توانند از طریق لیسیدن دهان به دهان به دیگر نشخوارکنندگان انتقال یابند) و در آخر به شرایط خاص همان نشخوارکننده توجه کرد.

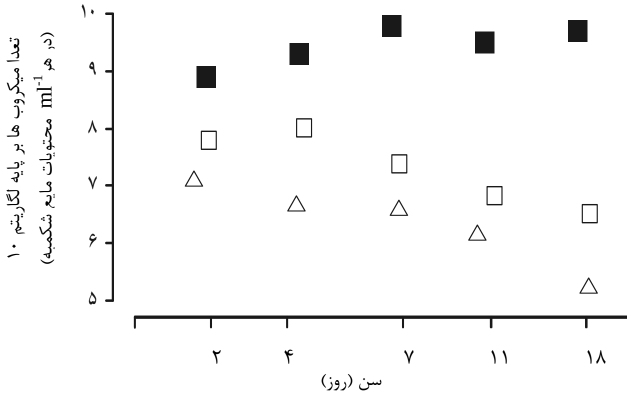
کارشناسان تاسیس جمعیت میکروبی دستگاه گوارش را جهت توسعه میکروارگانیسمی منوط به پایداری گونه میکروبی در شکمبه و انجام مراحل تخمیر عنوان می کنند. لذا نمی توان حضور میکروب ها را یک روز پس از تولد در شکمبه جزء جمعیت تاسیس شده میکروارگانیسمی تلقی کرد. به همین دلیل بافت فلور میکروارگانیسمی دام های شیرخوار با دام تازه از شیر گرفته شده و سایر

نشخوارکنندگان بالغ متفاوت می باشد. بطور مثال؛ جمعیت هایی فراوانی از باکتری های *Propionibacterium*، *Clostridium*، *Peptostreptococcus* و *Bififdobacterium* در شکمبه دام های جوان دیده می شود که در دام های بالغ رشد و توسعه این باکتری ها محدودتر می باشد. البته آزمایشات میکروسکوپی نشان می دهد که فلور میکروارگانیسمی شکمبه دام های جوان شیرخوار به شدت مشابه فلور میکروبی چسبیده به دیوار شکمبه دام های بالغ می باشد. بطور مثال؛ جمعیت باکتری های غالب اشاره شده در دام های جوان، در دیواره شکمبه دام های بالغ هم غالب می باشند. شکمبه دام های تازه متولد شده استریل و عاری از هر گونه میکروب می باشد و با افزایش سن، درصد حضور میکروب ها در شکمبه بیشتر و قدرت هاگزایی آنها کمتر می شود.

در صورت تصحیح کمیت و کیفیت خوراک مصرفی جامد، الگوهای جغرافیایی و منابع تامین غذا همراه با شرایط محیط شکمبه مانند اسیدیته، اولین گونه میکروبی پروتوزوئری تاسیس شده در شکمبه مربوط به فعالیت تاژک داران می باشد که شش روز پس از اولین خوراک جامد مصرف شده در دام های جوان مشاهده می شود. یعنی در هنگام تاسیس اولین فعالیت گروه های پروتوزوئری مژک دار در نهمین روز از مصرف خوراک جامد، تاژکداران حضور داشته و مشغول به افزایش در تعداد جمعیت خود می باشند. همچنین، تاسیس گونه های باکتریایی هم بدون پیش شرط هوازی یا بی هوازی بودن از روز دوم تولد آغاز می شود. طبق گزارشات ارائه شده توسط کارشناسان، شکمبه دام تازه متولد شده دارای باکتری های هوازی مانند استرپتوکوکوس، لاکتوباسیلوس و اشریشیاکلی می باشد که با استفاده از جیره های خشک به صورت تدریجی تغییر و فلور باکتریایی شکمبه از حالت هوازی به بی هوازی متمایل می گردد. البته لازم به ذکر است که حضور باکتری های بی هوازی از روز دوم بعد از تولد در شکمبه مشخص شده است (شکل ۷-۳)، اما به دلیل نوع خوراک مصرفی امکان فعالیت گسترده نداشته اند. بطور مثال؛ باکتری سلولایتیک و متان ساز از روز دوم تا چهارم بعد از تولد در شکمبه دیده می شوند. ولی تاسیس اولین کلونی های گونه های بی هوازی واقعی با مصرف ماده خشک آغاز و در ظرف ۱۰ روز کامل می گردد.

حضور قارچ های هوازی و بی هوازی همانند باکتری ها و پروتوزوئرها در شکمبه گوساله های شیرخوار به اثبات رسیده است. کارشناسان جهت تعیین زمان دقیق ورود قارچ ها و تاسیس کلونی واقعی آن در شکمبه هنوز با مشکل و تفاوت نظریه روبرو هستند. آنها معتقدند که فعالیت و تاسیس قارچ های هوازی چسبیده به دیواره شکمبه از روز اول تولد به صورت وسیع آغاز می شود. اما حضور قارچ های بی هوازی را از روزهای ۲۰-۱۰ پس از تولد گزارش نموده اند. این تفاوت معنی دار در گزارش ها حتی بین دو نژاد یکسان دامی با یک خوراک مشابه هم دیده می شود. بیشترین گونه های قارچی مشاهده

شده در ابتدای ورود به شکمبه و توسعه کلونی قارچی مربوط به *Neocallimastix frontalis* و *Sphaeromonas communis* می باشد.



شکل ۷-۳ توسعه باکتری ها در شکمبه نشخوارکننده تازه متولد شده. ■ باکتری های بی هوازی، □ باکتری های هوازی، Δ باکتری ایشرشیاکلی.

طبق نظر کارشناسان اولین فلور میکروبی مطلوب در شکمبه نشخوارکنندگان جوان که مشابه با نوع بالغ تر خود می باشند، مربوط به سن شش هفتگی پس از تولد است که با تغییر روند مدیریت می تواند از سن چهار هفتگی هم آغاز گردد. روند تغییر مدیریت بیشتر مربوط به سرعت از شیرگیری نشخوارکنندگان و عادت دادن حیوان به مصرف خوراک کاملا جامد معطوف می شود. آزمایشات نشان می دهد زمان ورود میکروارگانیسم ها در شکمبه با کیفیت خوراک مصرفی هیچ رابط معنی داری ندارد و تنها نوع توسعه جمعیت های میکروبی وارد شده به شکمبه وابسته به کیفیت خوراک مصرفی می باشد. لذا جهت رسیدن به بیشترین شباهت فلور میکروبی شکمبه دام تازه از شیر گرفته شده با روزهای بلوغ خود لازم است کیفیت خوراک مصرفی کنترل گردد. همانطور که قبلا اشاره گردید تنوع گونه های میکروبی به منطقه جغرافیایی و کیفیت خوراک مصرفی وابسته است. اما در صورت ثابت مانند شرایط جغرافیایی و منابع خوراکی، توسعه تنوع میکروبی به نحوه مصرف خوراک (کاملا مخلوط یا خوراکدهی به صورت مجزا) و نسبت اقلام موجود در خوراک مانند نسبت علوفه به مواد متراکم وابسته می باشد.

توسعه جمعیت میکروارگانیسمی در دام های تازه از شیر گرفته شده و یا شیرخوار که از خوراک مکمل شامل علوفه تازه با مواد متراکم مصرف می کند، آغاز می شود. در صورت قرار دادن اسیدیته شکمبه بر روند معادلات توسعه جمعیت میکروبی در همه دام های تازه متولد شده، بیشترین فعالان

میکروارگانیسمی مربوط به گروه های آمیلولایتیکی و میکروب های پشتیبان مانند متان سازها و یا پروتوزوئرهای مژک دار که مقاوم به اسیدیته بالا هستند (خانواده هلوتریش ها (*Isotrichidae*))، می باشد. سپس، فعالیت میکروارگانیسم های سلولایتیکی، قارچ های بی هوازی و سایر پروتوزوئرهای تاژک دار (*Trichomonas ruminantium*) و مژک دار (خانواده الیگوتریش ها (*Ophryoscolecidae*)) بر اساس افزایش سن دام جوان و مصرف خوراک های علوفه ای و خشبی افزایش می یابند. اما باید بدانیم که گونه های میکروارگانیسمی توسعه یافته در تمامی نشخوارکنندگان براساس نوع خوراک مصرفی در دسترس، منابع تامینی خوراک و نوع تولیدات تخمیری در دام ها متفاوت خواهد بود. بطور مثال؛ اولین گونه پروتوزوئری مژک دار که در نهمین روز از مصرف خوراک جامد دیده می شود با تغییر کمیت و کیفیت خوراک مصرفی، حضور آنها به روزهای ۱۴ و ۲۱ انتقال خواهد یافت. یعنی هر گاه pH به زیر ۶ سقوط نماید، روند توسعه گونه های میکروبی براساس قدرت بافری بزاق و دیواره شکمبه دام متفاوت می باشد و با تاخیر چند روزه همراه خواهد شد. بررسی های نشان داده است که تنوع بالای گونه های میکروبی و توسعه مناسب آنها همواره در pH بین ۶ تا ۶/۶ انجام می گیرد. لذا اسیدیته شکمبه که تحت تاثیر خوراک و نحوه مصرف آن قرار دارد، از دسته عواملی محسوب می گردد که می تواند برای گروهی از میکروب ها و حتی گونه هایی از یک خانواده میکروبی محدودیت ایجاد نماید و برای فعالیت گروهی دیگر مطلوب گردد. اسیدی شدن محیط شکمبه در دام های تازه از شیر گرفته و یا در حال شیر گرفتن، به دلیل مصرف خوراک با تجزیه پذیری سریع می باشد.

۴-۳ فرآیند تخمیر و الگوهای آن

شکمبه به دلیل ایجاد شرایط تخمیر به صورت دینامیک و پویا مهمترین کیسه تخمیری شناخته شده در بین اندام گوارشی می باشد. تخمیر توسط میکروارگانیسم های بی هوازی شکمبه انجام گرفته و هر میکروب تنها از یک ماده خاص خوراکی استفاده نمی کند. لذا مشکل می توان تعیین نمود که فعالیت های تخمیری بر روی ماده غذایی بیشتر تحت اثر کدام میکرواگانیسم می باشد. اما تخمیر دارای یک الگوی ویژه می باشدکه می توان آن را به دو بخش فیزیکی و شیمیایی تقسیم نمود. الگوی تخمیر براساس عوامل چهارگانه (۱) اثرات کمی و کیفی خوراک؛ مانند درصد قندهای محلول، میزان نیتروژن قابل دسترس و تعادل آن با انرژی، درصد اسیدهای چرب بلند زنجیره در جیره، فرآوری خوراک و افزودنی های خاص مثل یونفرها و آنتی بیوتیک ها، (۲) اثرات محیطی شکمبه؛ مانند تراکم یون هیدروژن، اسیدیته و فشار اسمزی، میزان انباشتگی اسیدهای چرب فرار در شکمبه و نرخ رقت، (۳)

اثرات میکروبی؛ مانند نرخ رشد و تجدید نسل، اثرات متقابل میکروارگانیسم ها و خاصیت های فیزیولوژیکی آنها و (۴) اثرات دامی و اقلیمی؛ مانند ظرفیت های شکمبه و شرایط آب و هوایی، به شکمبه دام تحمیل می شود. براساس همین الگوهای تحمیل شده به شکمبه می توان مبادرت به الگونویسی نموده و کنترل محیط شکمبه را انجام داد.

در تنظیم فرآیندهای تخمیری، تراکم یون هیدروژن از مهمترین فاکتورهای کنترل میزان تخمیر در شکمبه محسوب می شود. یون هیدروژن براساس فعالیت های میکروارگانیسمی جهت سنتز اسیدهای چرب فرار تولید و به مصرف سایر باکتری های تولید کننده متان می رسد. افزایش این ماده جهت ادامه تخمیر، نامطلوب و سبب کاهش کوفاکتور NAD^+ می شود. این کوفاکتور برای تخمیر سایر کربوهیدرات های بعدی ضروری و لازم است. فعالیت همزمان باکتری های سلولولایتیک و آمیلولایتیک با باکتری ها مصرف کننده هیدروژن سبب اکسیداسیون کامل مواد غذایی و تخمیر مطلوب می شود. برای فرآیندهای تخمیر، فاکتور اسیدیته مناسب شکمبه هم الزامی می باشد. افت سریع pH سبب توقف فعالیت های انتقال یون هیدروژن در دیواره میکروب ها شده و رشد و فعالیت میکروب ها را کاهش می دهد. میزان تجزیه پذیری ماده خشک به خصوص گروه الیاف وابسته به اسیدیته شکمبه می باشد. در pH زیر ۵/۵ به دلیل توقف فعالیت میکروبی، تخمیر قطع و روند هضم رو به اضمحلال می رود. البته تعدادی از میکروارگانیسم ها در اسیدیته بالا فعالیت می نمایند ولی دارای پایداری بسیار کمی می باشند. از فاکتورهای مهم دیگر در تنظیم فعالیت تخمیری مقدار اسیدهای چرب فرار تولید شده در شکمبه می باشد. غلظت نرمال اعلام شده این اسیدها بین ۱۰۰–۶۰ میلی مول به ازای هر لیتر محتویات شکمبه است. در این حالت تقریبا ۷۰–۶۲ درصد آن را اسید استیک، ۲۷–۱۶ درصد آن را اسید پروپیونیک، ۱۱–۶ درصد آن را اسید بوتیریک، ۵–۰/۵ درصد آن را اسید فورمیک، ۳/۲–۱/۶ درصد آن را اسید والریک، ۱–۰/۵ درصد آن را اسید کاپروئیک،۰/۶–۰/۳ درصد آن را اسید ایزوبوتیریک و ۰/۰۵–۰/۰۴ درصد آن را اسید هپتوئیک تشکیل می دهد. اسیدهای چرب فرار تولیدی براساس انتشار غیر فعال می توانند به سلول میکروبی نفوذ نمایند. غلظت بالای اسیدهای چرب فرار، فعالیت میکروب ها را براساس تغییر مقدار یون هیدروژن و اسیدیته شکمبه متوقف و روند تخمیر را خاموش می کنند. به دلیل افزایش بیشتر پروتون داخل سلولی توسط اسید بوتیریک سمیت این اسید در هنگام افزایش اسیدهای چرب فرار از سایر اسیدها بیشتر می باشد.

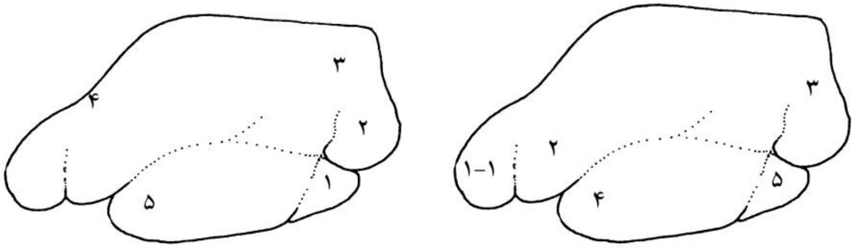
۳-۴-۱ الگوی فیزیکی تخمیر

کارشناسان الگوی فیزیکی تخمیر را به مجموعه عوامل فیزیکی که ماده خوراکی را برای تخمیر شیمیایی آماده می نمایند تعریف می کنند. لذا با تعریف فوق تخمیر فیزیکی از دهان آغاز و به حرکات شکمبه ختم می شود. در الگوی فیزیکی تخمیر تعیین و شناسایی قدرت انقباض (تابع نوع عضله می باشد)، فاصله بین دو انقباض و فراوانی حرکات یا انقباضات دستگاه گوارش (تابع نوع فعالیت دستگاه گوارش) اهمیت دارد. با تعیین واقعی فاکتورهای فوق و شناخت عوامل موثر بر آن می توان به کنترل الگوی فیزیکی تخمیر و راهکارهای مبارزه با اختلالات آن پرداخت.

در الگوی فیزیکی تخمیر، جویدن و یا نشخوار تنها جهت خرد کردن مواد غذایی و تغییر اندازه ذرات نیست. بلکه در این عمل مواد غذایی می توانند با بزاق ترشح شده از دهان که حاوی آب (تقریبا ۸۰ درصد مایع شکمبه را جهت فعالیت تخمیری شامل می شود)، ترشحات موکوسی و مواد معدنی (شامل یون های بی کربنات، فسفات ها، سدیم، پتاسیم، کلر، اوره، انواع پروتئین های آنزیمی و غیره می باشد) می باشد، ترکیب تا علاوه بر نقل و انتقال ساده و راحت مواد غذایی امکان ادامه تخمیر و تنظیم آن میسر گردد. مشارکت بزاق در تعادل میکروبی شکمبه از طریق کنترل اسیدیته شکمبه، فشار اسمزی، تامین نیتروژن مورد نیاز میکروب ها و خنثی سازی اسیدهای آلی تشکیل شده در شکمبه از طریق مواد تامپونی ضروری به نظر می رسد. بزاق می تواند باعث جلوگیری از تشکیل حباب های گاز در شکمبه شده و فعالیت های شکمبه را بهبود بخشد. جویدن و یا نشخوار خوراک سبب تشکیل اندازه مطلوب ذرات غذایی جهت تخمیر میکروبی شده و تخمیر شیمیایی را افزایش می دهد. اندازه ذرات طبق گزارشات ارائه شده می تواند با تنظیم نرخ عبور و مدت زمان ماندگاری خوراک در شکمبه تخمیر و تعادل میکروبی را مطلوب نماید.

حرکات شکمبه از دیگر الگوهای فیزیکی تخمیر محسوب می شود که به طور کامل با نوع خوراک مصرفی و میزان فعالیت تخمیری هماهنگی دارد. ثبت حرکات شکمبه و نگاری از طریق فیستولا، قرار دادن بالن های حساس به فشار (معادله لاپلاس) و رادیوگرافی نشان داده است که مجموعه انقباضات شکمبه- نگاری به صورت چرخشی و به دو شکل اولیه و ثانویه انجام می گیرد (شکل ۸-۳). انقباض اولیه که به الگوی انتشار Z و یا انقباض دو مرحله ای معروف است سبب بهبود شرایط تخمیر از طریق سایش یا مخلوط کردن محتویات شکمبه و کنترل جذب و عبور مواد مغذی می شود. در انقباض اولیه موج تولید شده از نگاری آغاز و به شیار نگاری - شکمبه رفته و از آنجا به کیسه کور عقبی پشتی شکمبه هدایت می شود. سپس از طریق کیسه شکمی جلویی به کیسه کور عقبی شکمی انتقال می یابد. انقباضات نشخوار که شناخته ترین توالی حرکات معده جهت تخمیر فیزیکی می باشد، همانند انقباض اولیه انجام می گیرد. اما توالی نشخوار با انقباض اولیه در شروع نوع انقباض متفاوت بوده و توالی

نشخوار فقط دارای یک انقباض تک پالسی در نگاری می باشد. در توالی نشخوار علاوه بر شکمبه عضلات ماهیچه تنفسی، حنجره، حلق، مری و اعضای داخلی دهان شرکت می کنند. توالی نشخوار همواره با انقباضات ثانویه همراه است.



شکل ۸-۳ مراحل انقباضات شکمبه – نگاری. تصویر سمت راست مربوط به انقباض اولیه و سمت چپ مربوط به انقباض ثانویه است.

انقباض ثانویه که به توالی O یا توالی آروغ معروف است سبب خروج گازهای تولیدی و خروج هیدروژن اضافی از شکمبه جهت بهبود تخمیر می شود. این انقباض ناشی از اتساع دیواره فوقانی شکمبه بر اثر تجمع گازهای متان و دی اکسید کربن انجام می گیرد. در این انقباض موج حرکتی از کیسه کور عقبی شکمی آغاز و به کیسه کور عقبی پشتی رفته و به سمت جلو حرکت می کند. مجموعه انقباضات اولیه و ثانویه در کنترل و سرعت فرآیند تخمیر شیمیایی اهمیت بسزایی دارند. محتویات لایه لایه شده در شکمبه براساس همین انقباضات از بین رفته و تعادل میکروبی در تمامی محتویات شکمبه یکسان تثبیت می شود.

حرکات شکمبه و فعالیت های دهانی می توانند الگوی فیزیکی تخمیر را برای افزایش شناوری و کاهش رسوب گذاری مواد مغذی، بهبود اکوسیستم شکمبه، کاهش اندازه ذرات غذایی و دسترسی بیشتر میکروب ها به مواد مغذی تکمیل نمایند. در صورت فقدان حرکات اشاره شده در دهان و شکمبه، محتویات شکمبه به چهار منطقه غذایی بدون حرکت و اختلاط تقسیم و فعالیت تخمیری در اندک زمانی کاهش و یا متوقف می گردد. کشیده شدن دیواره شکمبه به دلیل مصرف خوراک های علوفه ایی در مقابل خوراک های متراکم تر سبب بیشتر شدن حرکات شکمبه و تغییر الگوی تخمیری می شود. همچنین تکرار انقباضات در هنگام مصرف علوفه خشبی در مقابل علوفه تازه بیشتر خواهد بود. این نوع الگوی حرکتی در تخمیر سبب کسب انرژی بیشتر از حداقل مواد غذایی می شود. گیرنده های بارو یا کشش (*Barorecepteur*) و گیرنده های مخاطی یا شیمیایی شکمبه–نگاری در تعیین الگوی تخمیر فیزیکی نقش اساسی دارند. گیرنده های مخاطی که شامل حسگرهای شیمیایی هم می باشند، به دلیل

نوع تحریک پذیری توسط اسیدهای چرب فرار تولید شده بخصوص اسیدبوتیریک و پروپیونیک می توانند پل ارتباطی الگوی تخمیر فیزیکی با تخمیر شیمیایی باشند.

از دیگر فاکتورهای مهم الگوی فیزیکی تخمیر، بلع خوراک و نرخ عبور مواد از شکمبه می باشد. در زمان ازدیاد تخمیر شیمیایی و بالا رفتن انرژی قابل دسترس میکروبی به علت کاهش استات و افزایش پروپیونات مقدار مصرف خوراک به دلیل تغییر الگوی فیزیکی بلع کاهش می یابد. در این حالت دستگاه گرسنگی و سیری با حسگرهای شیمیایی مخاطی خود در شکمبه مبادرت به تغییر و یا خاموش کردن الگوی فیزیکی بلع نموده و میزان تخمیر را براساس کاهش نهاده های ورودی کنترل می نماید. از طرف دیگر، الگوی فیزیکی تخمیر با افزایش یا کاهش نرخ عبور مواد مغذی شکمبه از طریق حرکات شکمبه میزان تخمیر شیمیایی را کنترل می نماید. روش کنترلی نرخ عبور باز توسط حسگرهای شیمیایی مخاطی انجام می شود. هر گاه نرخ هضم کاهش یابد، حسگرهای شیمیایی حرکات شکمبه را به سمت کمتر شدن نرخ عبور و بیشتر شدن نشخوار بیشتر هدایت می نمایند.

از فاکتورهای تشخیص سلامت الگوی فیزیکی تخمیر شکمبه، فرآیند نشخوار و مدت زمان آن می باشد. نشخوار که از مجموع حرکات منظم شکمبه و دهان در طی تخمیر فیزیکی ایجاد می شود، با کشش آرام در دیواره شکمبه آغاز و با بیش از حد شدن فشار بر دیواره شکمبه قطع می گردد. لذا با کنترل نشخوار می توان به روند فعالیت فیزیکی تخمیر پی برد. بطور مثال؛ نفخ که از عوامل تخریب نشخوار کردن محسوب می شود، می تواند به دلیل کشیدگی بیش از حد بر دیواره شکمبه الگوی فیزیکی تخمیر را متوقف و الگوی شیمیایی تخمیر و اکوسیستم میکروبی شکمبه را تغییر دهد. همچنین، مدت زمان نشخوار و نرخ آن با تغییر الگوی فیزیکی تخمیر به دلیل تغییر کمیت و کیفیت خوراک مصرفی و سلامت دستگاه گوارش تغییر خواهد کرد. بطور مثال؛ با افزایش ترکیبات سلولزی و همی سلولزی به جیره و یا بهبود فیبر موثر جیره مدت زمان نشخوار افزایش یافته و این افزایش در مدت زمان نشخوار الگوهای فیزیکی تخمیر مانند نحوه جویدن و یا تعداد آروغ زدن و تولیدات نهایی تخمیر را تغییر خواهد داد. تولیدات نهایی تخمیر مانند افزایش غلظت اسیدهای های چرب فرار یا آمونیاک تولیدی می تواند نشخوار را قطع و الگوی فیزیکی تخمیر را متوقف و یا جهت خروج سریعتر مواد از شکمبه الگوی شیمیایی و فیزیکی تخمیر را تغییر دهد. براساس ارتباط نشخوار با الگوی فیزیکی تخمیر است که می توان فاکتورهایی چون فیبر موثر جیره و اندازه ذرات غذایی را به الگوی فیزیکی تخمیر ارتباط داد. البته آزمایشات نشان می دهد که تغییر الگوهای شیمیایی تخمیر به تغییرات الگوهای فیزیکی تخمیر وابسته بوده و ارتباط این دو الگو تنگاتنگ، همزمان و دو طرفه می باشد. بطور مثال؛ تفاوت در

مقدار اسیدهای چرب فرار به دلیل تغییر در فرآیندهای شیمیایی تجزیه خوراک مصرفی و تولیدات نهایی آن می تواند سبب قطع الگوی فیزیکی تخمیر یا افزایش آن گردد.

۲-۴-۳ الگوی شیمیایی تخمیر

الگوی شیمیایی تخمیر نامی است که به سلسله توالی یا روندهای شیمیایی بکار رفته توسط میکروب یا گروهی از آنها در شکمبه رخ می دهد، اطلاق می گردد. برخی از این روندها ترکیبات را شکسته و به عناصر سازنده خود تبدیل می کنند و بعضی دیگر عناصر جدیدی را براساس نیاز می سازند. در جهت مطالعه بهتر الگوی شیمیایی تخمیر می توان آن را بر چهار فاز کلی (۱) تولیدات تخمیری، (۲) روندها و فرآیندهای شیمیایی تخمیر، (۳) عوامل موثر بر تخمیر و (۴) بحران ها و تهدیدات وارده بر تخمیر طبقه بندی نمود.

۱-۲-۴-۳ تولیدات تخمیری

جیره های نشخوارکنندگان حاوی مواد مختلف مانند کربوهیدرات ها (ساختاری و غیرساختاری)، پروتئین ها (نیتروژن واقعی و نیتروژن غیر پروتئینی)، لیپیدها و اقلام ریز مغذی (معدنی، ویتامینه، محرک ها و مواد ضد تغذیه ایی) می باشد. نشخوارکنندگان با کمک میکروارگانیسم ها می توانند آنها را به اقلام مورد نیاز خود مانند اسیدهای چرب فرار، پروتئین های میکروبی، اسیدهای چرب آزاد و انواع ویتامین ها تبدیل نمایند. الگوی شیمیایی تخمیر متاثر از نوع تولیدات میکروبی براساس کمیت و کیفیت خوراک مصرفی می باشد. بطور مثال؛ حضور قندهای محلول و سریع تجزیه مانند ملاس همراه با فروکتان ها و نشاسته، الگوی شیمیایی تخمیر را به سمت تولید بیشتر اسیدپروپیونیک، بوتیریک و لاکتیک سوق می دهد. در حالیکه بعلت ازدیاد اسید پروپیونیک در شکمبه، الگوی شیمیایی تخمیر به سمت کاهش یا توقف تولید اسید استیک حرکت کرده و تجزیه مواد سلولزی را کاهش می دهد. باید در نظر داشت که مجموع تولید اسیدهای چرب فرار در طی تخمیر بدون تغییر باقی می ماند و کمتر تحت تاثیر الگوی شیمیایی تخمیر قرار می گیرد. اما نسبت اسیدهای چرب فرار با تغییر الگوی شیمیایی تخمیر به دلیل تغییر کمیت و کیفیت خوراک مصرفی مانند افزایش نسبت علوفه به مواد متراکم یا بکارگیری بیشتر کربوهیدرات ساختاری، متغیر خواهد بود. نسبت اسیدهای چرب فرار در هنگام مصرف کربوهیدرات ساختاری به سمت تولید اسیداستیک سوق پیدا می کند. استات تولیدی می تواند الگوی شیمیایی تخمیر را به سمت هضم بیشتر الیاف و تداوم فعالیت باکتری های متان زا جهت کاهش هیدروژن تولیدی هدایت نماید. لذا می توان با تغییر الگوی شیمیایی تخمیر از طریق بکارگیری کربوهیدرات های خاص مانند سلولز و همی سلولز سرعت و نرخ تخمیر را دستکاری کرد. غلظت

اسیدهای چرب فرار که تابع کمیت و کیفیت خوراک مصرفی و مدت زمان حضور آن در شکمبه دارد، بین ۱۵۰-۵۰ میلی مول در لیتر (معادل ۱۰-۵ گرم در لیتر) متغیر است. علت این نوسان را می توان در الگوی شیمیایی تخمیر وابسته به خوراک مصرفی جستجو کرد که از طریق کنترل اسیدیته و به صورت هماهنگ با pk_a اسیدهای چرب فرار صورت می گیرد. الگوی شیمیایی تخمیر می تواند با تحمیل افزایش سرعت جذب و یا کاهش تولید اسیدهای چرب فرار، محیط شکمبه و غلظت اسیدهای آلی را دستخوش تغییر نماید. همچنین، این الگوی می تواند از طریق غلظت اسیدهای چرب فرار میزان مصرف خوراک را نیز کنترل نماید. از آنجا که ۷۰ درصد انرژی دام از طریق اسیدهای چرب فرار تولید می شود، لذا با تولید بیشتر اسیدهای چرب فرار در شکمبه الگوی شیمیایی تخمیر به سمت کاهش مصرف خوراک پیش می رود. کاهش مصرف خوراک می تواند تولیدات تخمیری را براساس تغییر الگوی فیزیکی تخمیر که وابسته به الگوی شیمیایی تخمیر است، تغییر دهد.

الگوی شیمیایی تخمیر تنها از طریق اسیدهای چرب فرار کنترل نمی شود. بلکه از طریق غلظت آمونیاک تولیدی می تواند تنظیم و فرآیندی های تخمیری دیگر عناصر را کاهش یا افزایش دهد. آمونیاک تولید شده ناشی از تخمیر پروتئین ها می تواند نقش جدیدی از فعالیت های تخمیری را شکل دهد. از آنجا که آمونیاک ماده حد واسط کلیدی در ساخت پروتئین های میکروبی محسوب می شود. الگوی شیمیایی تخمیر می تواند با قرار دادن آن در کنار اسیدهای چرب فرار بخصوص استات و بوتیرات، فعالیت های تخمیری میکروارگانیسم ها را کنترل نماید. با بیش بود آمونیاک در جیره مصرفی الگوی شیمیایی تخمیر به سمت جذب بیشتر آمونیاک و یا تولید آمونیوم پیش می رود تا محیط شکمبه مساعد باقی بماند. اما در اثر کمبود آمونیاک الگوی شیمیایی تخمیر می تواند با تحریک دیواره شکمبه و بزاق از طریق گیرنده های شیمیایی به ترشحات اوره ای دامن بزند. کاهش و یا افزایش غلظت آمونیاک از دامنه ۸۵ تا ۳۰۰ میلی گرم در لیتر براساس نوع کربوهیدرات های موجود، می تواند الگوی شیمیایی تخمیر را به ترتیب افزایش و یا خاموش نماید. تحمل نوسان غلظت آمونیاک در شکمبه وابسته به نوع کربوهیدرات در دسترس و یا تعادل نسبت انرژی به پروتئین دارد. الگوی شیمیایی تخمیر می تواند از طریق قابلیت هضم پروتئین ها وابسته به اسیدیته در مراحل رشد و توسعه میکروب ها نفوذ و مراحل تخمیر مواد مغذی را براساس نیاز دام الگونویسی نماید. اسیدیته بالا هضم پروتئین ها را به دلیل کاهش فلور میکروبی کاهش می دهد. الگوی نامناسب شیمیایی تخمیر پروتئین ها (افزایش بیش از حد غلظت آمونیاک) می تواند سبب کاهش فعالیت الگوی فیزیکی تخمیر شود و خاموشی تخمیر میکروبی را رقم بزند.

از طرف دیگر، الگوی شیمیایی تخمیر می تواند از طریق اسیدهای چرب آزاد شده توسط لیپاز کنترل گردد. از آنجا که ظرفیت هضم لیپید توسط میکروارگانیسم های شکمبه به شدت محدود می باشد، ازدیاد اسیدهای چرب در شکمبه (بیش از ۱۰۰ گرم در هر کیلوگرم) می تواند الگوی شیمیایی تخمیر را کاهش و یا تغییر دهد. با ازدیاد لیپیدها و تولیدات آن الگوی شیمیایی تخمیر به سمت کاهش هضم الیاف پیش می رود. کاهش هضم می تواند الگوی فیزیکی تخمیر را متوقف و مصرف خوراک را کم کند. شکمبه با تغییر الگوی شیمیایی خود سبب جذب سریعتر اسیدهای چرب کوتاه زنجیر شده و با خروج بیشتر چربی ها از شکمبه توسط حسگرهای شیمیایی- فیزیکی، تخمیر میکروبی را به حالت اول باز می گرداند. همچنین حضور اسیدهای چرب غیراشباع می تواند با تغییر جزئی الگوی شیمیایی بوسیله حذف هیدروژن محیط شکمبه بوسیله بیوهیدروژناسیون، روند تخمیر و افزایش اسیدهای چرب فرار را بهبود بخشد.

۲-۲-۴-۳ روندها و فرآیندهای شیمیایی تخمیر

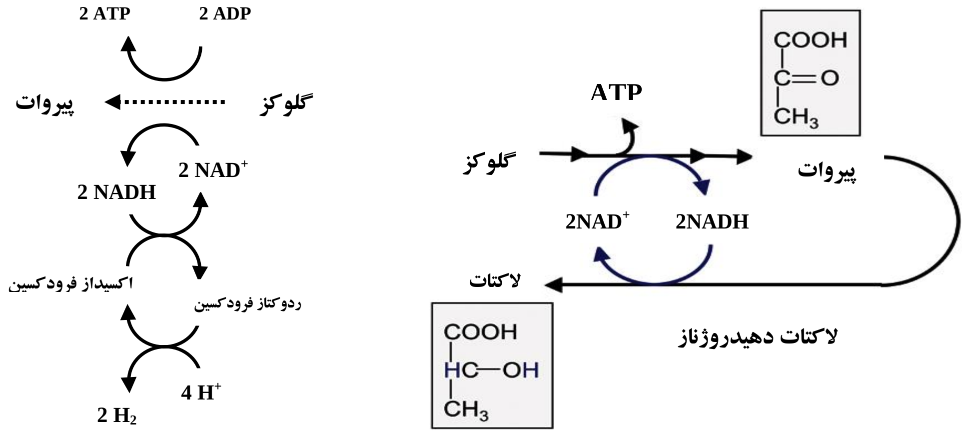
یکی از راه های شناخت تخمیر مواد مغذی در شکمبه و تحمیل یک الگوی جدید برای ادامه بهتر آن، آشنایی با مسیرهای بیوشیمیایی تخمیر براساس نوع ماده خوراکی مصرفی می باشد. از آنجا که اکولوژی محیط شکمبه اجازه تشکیل فرآیندهای هوازی تخمیر را به میکروارگانیسم ها نمی دهد، لذا شناخت روندها و توالی های بی هوازی و میانبرهای آن جهت ارائه یک الگوی شیمیایی تخمیر نسبت به روندهای هوازی ضروری تر به نظر می رسد.

از آنجا که نتایج روندهای بیوشیمیایی تخمیر بی هوازی توسط میکروارگانیسم ها، تولید انرژی و پروتئین میکروبی جهت اعمال حیاتی میکروب می باشد. اما در کنار این تولیدات، تولید اسیدهای چرب فرار و توده پروتئینی در غالب سلولی میکروبی به جا مانده از تخمیر برای دام نشخوارکننده حیاتی است، که توسط تخمیر بی هوازی حاصل می گردد. بدین منظور جهت شناخت بهتر الگوی شیمیایی تخمیر لازم است روند تولید هر ماده تخمیر شده به صورت مجزا بررسی و سپس اثرات متقابل آن را با سایر مواد بررسی نماییم. اولین فرآیند حیاتی در شناسایی الگوی شیمیایی تخمیر بررسی چگونگی تولید اسیدهای چرب فرار و کنترل آنها می باشد (جدول ۳-۳). همانطور که در شکل ۴-۲ نشان داده شده است کلید ورود کربوهیدرات ها به تخمیر بی هوازی گلوکز از طریق پیروات است که براساس نوع الگوی شیمیایی تحمیل شده توسط مجموعه محیط شکمبه و خوراک مصرفی به یکی از راههای تولید اسید چرب فرار وارد می گردد. ماده حد واسط در تخمیر اسیدهای چرب فرار اسید پیروویک است که در مسیر گلیکولیز تولید می شود.

جدول ۳-۳ فرمول شیمیایی اسیدهای چرب فرار اصلی در محتویات شکمبه.

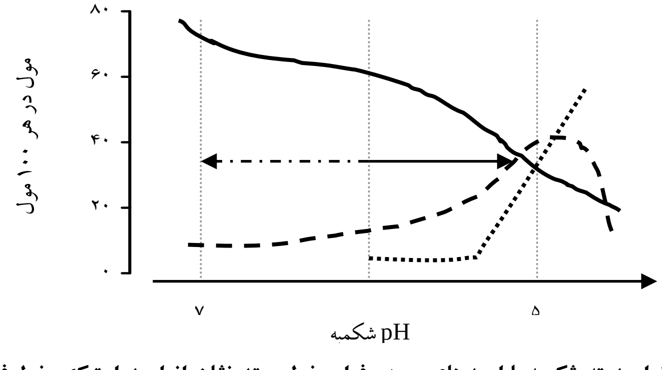
ردیف	نام اسید	فرمول شیمیایی
۱	اسید لاکتیک	CH_3 - CHOH - COOH
۲	والریک	CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH
۳	اسید ایزوبوتیریک	CH_3 - CH - (CH_3) - COOH
۴	اسید استیک	CH_3 - COOH
۵	اسید پروپیونیک	CH_3 - CH_2 - COOH
۶	اسید بوتیریک	CH_3 - CH_2 - CH_2 - COOH

از آنجا که در تشکیل پیروات نیاز به کوآنزیم NDA^+ جهت اکسید گلیسرآلدئید-۳- فسفات به۳- فسفوگلیسرول فسفات می باشد و تحت شرایط بی هوازی اکسیژن برای اکسیداسیون NDA^+ احیا شده از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو در دسترس نیست. لذا در چنین شرایطی اکسیداسیون NDA^+ احیا شده به وسیله لاکتات دهیدروژناز و یا ردوکتاز فرودکسین انجام می گیرد (شکل ۹-۳). در صورت فقدان اکسیداسیون $NAD(+H)^+$ توسط موارد فوق روند تولید اسید پیرووویک متوقف خواهد شد. البته لازم به ذکر است که تجمع بیش از اندازه لاکتات از طریق لاکتات دهیدروژناز می تواند روند تخمیر را کاهش یا متوقف نماید. به همین دلیل الگوی شیمیایی تخمیر با تحمیل مسیر آکریلات، اسید لاکتیک اضافی را به پروپیونات تبدیل و محیط شکمبه را مطلوب می نماید.



شکل ۹-۳ تخمیر هوموهلاکتیک یا اکسیداسیون NDA^+ احیا شده توسط لاکتات دهیدروژناز در سمت راست و ردوکتاز فرودکسین در سمت چپ.

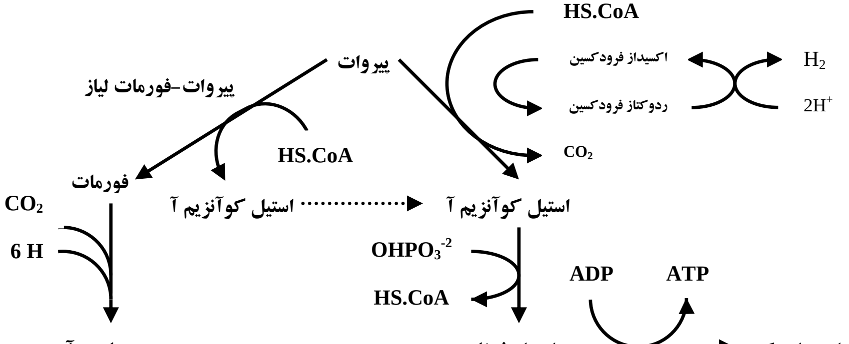
بعد از تشکیل پیروات شرایط خوراک مصرفی (کمیت و کیفیت) به طور مستقیم نسبت و تراکم اسیدهای چرب فرار تولید شده از پیروات را تحت تاثیر قرار می دهد. جیره هایی که بر پایه علوفه تولید شده است و یا حاوی کربوهیدرات های ساختاری مانند سلولز و همی سلولز می باشد، الگوی شیمیایی تخمیر را به سمت تولید اسید استیک و ثبات بیشتر تولید اسیدهای چرب فرار هدایت می کند. اما جیره های متراکم تر مانند جیره هایی که بر پایه غلات، نشاسته و یا کربوهیدرات های غیر ساختاری می باشد، الگوی شیمیایی تخمیر را به سمت تولید اسید پروپیونیک سوق می دهد. محیط شکمبه هم توسط تغییرات اسیدیته که بر پایه نحوه مصرف و کیفیت خوراک می باشد، می تواند بر تولید اسیدهای چرب فرار و نسبت بین آنها موثر واقع شود. بدین صورت که با افزایش اسیدیته از حالت pH ۶/۵ به ۵/۵ میزان تولید اسید استیک کاهش و مقدار اسید پروپیونیک و اسید لاکتیک افزایش می یابد (شکل ۱۰-۳). تغییرات اسیدیته شکمبه تحت تاثیر مواد سریع التخمیر مانند قندهای محلول و یا ترکیب جیره مصرفی می باشد که با افزایش اسیدیته الگوی شیمیایی تخمیر به سمت هضم کمتر فیبر و افزایش فعالیت باکتری های آمیلولایتیک سوق پیدا می کند.



شکل ۱۰-۳ ارتباط اسیدیته شکمبه با اسیدهای چرب فرار. خط ممتد نشان از اسید استیک، خط فاصله نشان از اسید پروپیونیک و نقطه چین نشان از اسید لاکتیک می باشد. فلش سیاه ممتد محدوده فعالیت فلور میکروبی آمیلولایتیک و فلش نقطه چین محدوده فعالیت فلور سلولایتیک را نشان می دهد.

برای تولید اسید استیک چهار راه اصلی متابولیسمی دیده می شود، که با هم شباهت زیادی دارند. اما روش هایی که از تشکیل فورمات و استیل کوآنزیم آ تبعیت می کنند و همچنین روش فرودکسین احیا کننده که سبب تولید دی اکسیدکربن و استیل کوآنزیم آ می شود، بیشتر استفاده می گردد (شکل ۱۱-۳). باید در نظر داشت که غالب تولید اسید استیک از روش اکسیدردوکتاز فرودکسین می باشد. همچنین، فورمات تولید شده از مسیر دوم سنتز استات می تواند جهت تولید متان مورد استفاده قرار گیرد. فورمات با مصرف هیدروژن و دی اکسیدکربن، محیط را برای تولید استات مساعدتر می نماید.

دو مسیر فرعی دیگر سنتز استات از طریق مصرف پیروات و گروه یونی فسفر توسط آنزیم فسفوترانس آکریلاز و تشکیل اسید استیک، اسیدفسفریک، آب و فورمات یا هیدروژن اقدام به فعالیت می نمایند. لازم به ذکر است که هیدروژن تولید شده در مسیر اکسیدردوکتاز فرودکسین شکل ۱۱-۳ به غلظت هیدروژن شکمبه حساس نبوده و در حضور یا غیاب میکروب های متان زا فعالیت خود را انجام خواهند داد. هیدروژن تولید شده از مسیر اکسیدردوکتاز فرودکسین شکل ۹-۳ به غلظت هیدروژن شکمبه حساس و در عدم حضور میکروب های متان زا به دلیل افزایش غلظت هیدروژن متوقف خواهد شد. این مسئله نشان می دهد که فعالیت لاکتات دهیدروژناز در تخمیر گلوکز یک فرآیند حیاتی محسوب می شود. البته در صورت کارآ نبودن مسیر لاکتات دهیدروژناز توسط میکروب های هومولاکتیک، میکروب های هترولاکتیک مسیر تولید اتانول از استالدئید را بوسیله الکل دهیدروژناز آغاز نموده و NAD^+ مورد نیاز تخمیر را تا حد معینی تامین می نمایند.

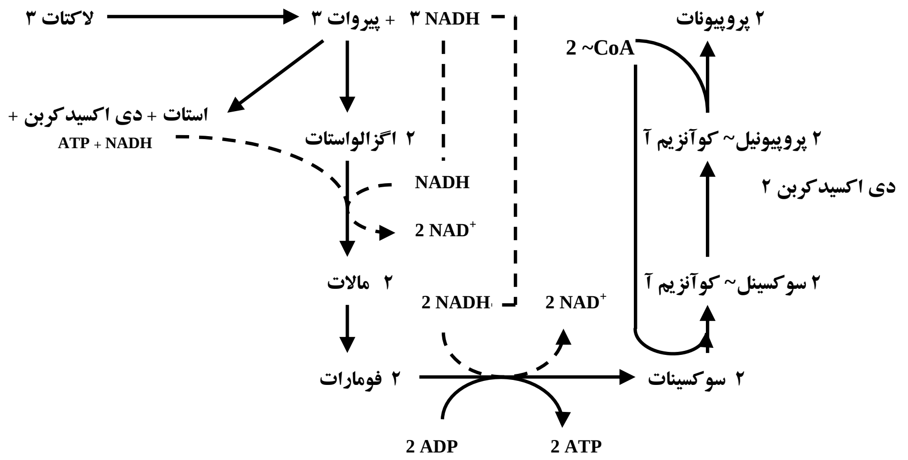


شکل ۱۱-۳ مسیرهای تشکیل استات از دو راه اصلی اکسیدردوکتاز و فورمات.

اما در صورت افزایش کربوهیدرات های غیرساختاری در جیره الگوی شیمیایی تخمیر به سمت تولید اسیدپروپیونیک با تولید انرژی کمتر در حد ۴ مول ATP سوق پیدا می کند. همانطور که در شکل ۴-۲ اشاره شده است میکروارگانیسم ها جهت تولید اسید پروپیونیک از دو مسیر کلی آکریلات و اسید دی کربوکسیلیک استفاده می نمایند. استفاده از مسیر اسید دی کربوکسیلک جهت تولید اسید پروپیونیک به دلیل تولید کامل پروپیونات از پیروات مناسب تر می باشد.

از طرف دیگر به دلیل تجمع لاکتات در مسیر آکریلات و همچنین توقف این مسیر در زمان فقدان گوگرد در شکمبه، میکروارگانیسم ها غالب اوقات (بیش از ۶۰ درصد) از مسیر اسید دی کربوکسیلیک استفاده می کنند. البته در زمان مصرف خوراک با نشاسته بسیار بالا مسیر آکریلات ارجح تر از مسیر

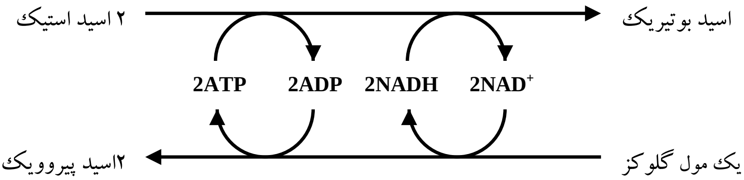
اسید دی کربوکسیلیک می باشد. مسیر اسید دی کربوکسیلیک نیاز به مصرف هیدروژن دارد که از طریق NADH و گاه FADH تامین شده از مسیرهای مختلف بیوشیمیایی صورت می گیرد (شکل ۱۲-۳). لذا می توان علت اصلی کاهش متان در هنگام مصرف مواد متراکم تر را مسیر اسید دی کربوکسیلیک در تولید پروپیونات دانست. آنزیم های فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز، پیروات کربوکسیلاز و متیل مالونیل کوآنزیم آ کربوکسیل ترانسفراز مشهور ترین کنترل کننده های مسیر اسید دی کربوکسیلیک می باشند. اما مالات دهیدروژناز، سوکسینات دهیدروژناز، فوماراز، سوکسینات کوآنزیم آ سنتتاز هم در مسیر مربوطه شرکت می کنند.



شکل ۱۲-۳ تولید اسیدپروپیونیک از مسیر دی کربوکسیلیک اسید. تامین کوآنزیم NADH توسط خط چین نشان داده شده است.

سومین اسید چرب فرار مهم در شکمبه اسید بوتیریک است که تحت تاثیر الگوی شیمیایی تخمیر می تواند شرایط مطلوب اکسیداسیون- احیا را در شکمبه فراهم نماید. گزارشات ارائه شده نشان می دهد که نوسانات موثر بر اسیدهای چرب فرار در این اسید چرب کمتر بوجود می آید. از نظر انرژی زایی سنتز اسید بوتیریک معادل سه مول ATP می باشد که در شرایط تخمیر میکروبی قابل بررسی است. باید در نظر داشت که میزان انرژی تامینی بعضی میکروب ها از طریق مسیر اسید بوتیریک تامین شده و این سنتز وابستگی آنها را به مسیر گلیکولیز کاهش خواهد داد. کارشناسان دو راه اصلی جهت سنتز اسید بوتیریک در شکمبه شناسایی کرده اند که تقریبا ۷۰ درصد آن را بر پایه استات در نظر می گیرند. از آنجا که در طی سنتز اسید بوتیریک NADH به NAD^{+} تبدیل می شود، میکروارگانیسم ها می توانند در شرایط نامطلوب و در حالت فقدان کوآنزیم آزاد، NAD^{+} یا FAD^{+} خود را از این مسیر

تامین کنند (شکل ۱۳-۳). با وجود راه های متفاوت سنتز اسید بوتیریک، راه اول سنتز اسید بوتیریک مسیر مالونیل کوآنزیم آ می باشد که در شکل ۴-۲ ارائه شده است.



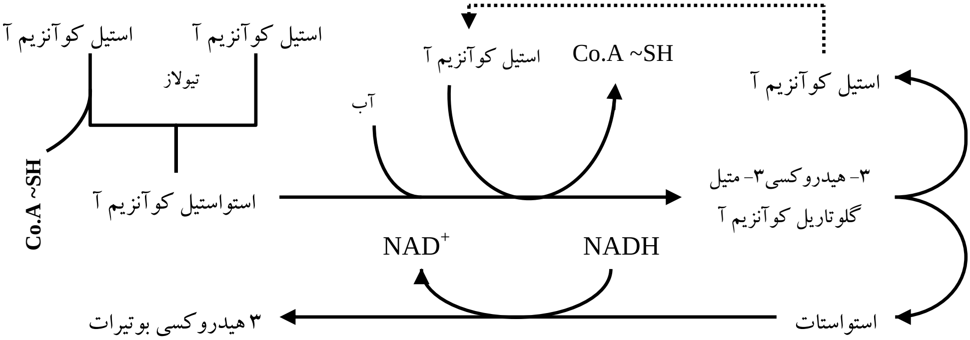
شکل ۱۳-۳ تبادل کوآنزیم NAD^+ بین سنتز اسید بوتیریک و و سنتز اسید پیرووویک.

مسیر مالونیل کوآنزیم آ بیشتر برای تشکیل اسیدهای چرب فرار بلند زنجیره کارآ بوده و در مسیر سنتز نیاز به دو مول استات و دو مول ATP در آن ضروری می باشد. اما مسیر دوم که به راه معکوس اکسیداسیون بتا معروف است، تحت تاثیر الگوی شیمیایی تخمیر و در حضور اسیدهای چرب بوجود آمده و نیاز کمتری به انرژی (یک مول ATP) مصرفی دارد.

در مسیر دوم سنتز اسید بوتیریک، استواستیل کوآنزیم آ ماده آغازین سنتز محسوب شده و در این مسیر آنزیم های ۳ - هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل کوآنزیم آ سنتتاز، ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز و ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل کوآنزیم آ لیاز در میتوکندری کلید ساخت بوتیرات محسوب می گردند (شکل ۱۴-۳). میکروارگانیسم ها می توانند مسیر دوم سنتز اسید بوتیریک را از آسیل کوآنزیم های جدا شده از اسیدهای چرب موجود در جیره مصرفی انجام دهند. در این واکنش آنزیم تیولاز علاوه بر آنکه در سنتز استواستیل کوآنزیم آ شرکت دارد، فاکتور اساسی تجزیه اسیل چرب محسوب می گردد.

سایر اسیدهای چرب فرار سنتز شده در شکمبه براساس تحمیل الگوی شیمیایی تخمیر تشکیل می شوند. بطور مثال؛ ازدیاد اسید استیک می تواند زمینه تولید اسید کاپروئیک را فراهم نماید. و یا در اثر ازدیاد اسیدهای آمینه والین و گلیسین تولید اسید ایزوبوتیریک و از ایزولوسین تولید اسید ۲ متیل بوتیریک افزایش می یابد. اما سنتز اسیدهای چرب تنها تعیین کننده نوع الگوی شیمیایی تخمیر نمی باشد. توازن اسیدهای چرب فرار از عامل های موثر در الگوی شیمیایی تخمیر است که به دلیل پیچیده بودن شناسایی و سخت بودن شبیه سازی آن در شرایط آزمایشگاهی از دید بسیاری از کارشناسان مخفی مانده است. بطور مثال؛ جدول ۴-۳ نشان می دهد که با تغییر نسبت های اسیدهای چرب فرار، الگوی شیمیایی تخمیر جهت تولید متان به دلیل تغییر هیدروژن تولیدی تغییر خواهد کرد. با افزایش نسبت اسید

چرب پروپیونیک در مقابل استیک می توان میزان متان تولیدی را کمتر و توسعه باکتری های متان ساز را کاهش داد.



شکل ۱٤-۳ سنتز اسید بوتیریک توسط استواستیل کوآنزیم آ.

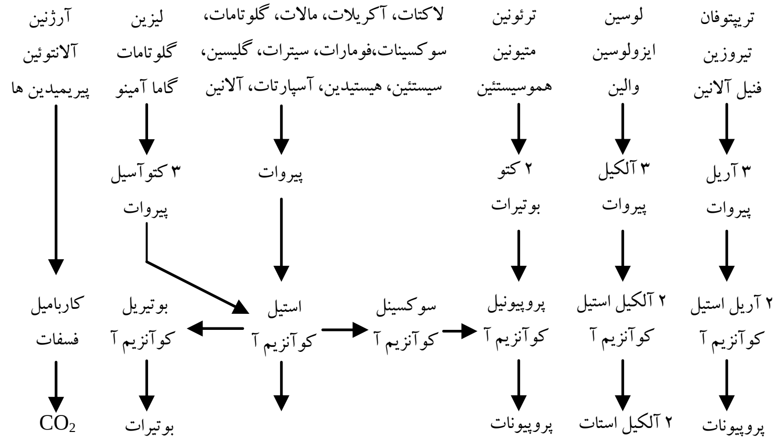
دومین فاکتور حیاتی در تعیین الگوهای شیمیایی تخمیر، نیتروژن و چرخه آن در شکمبه می باشد. الگوی شیمیایی تخمیر نیتروژن در شکمبه تابع سه مرحله اساسی (۱) ورود به چرخه پروتئین سازی در سلول میکروبی، (۲) جذب از دیواره شکمبه و (۳) نرخ عبور می باشد. تغییر هر یک از موارد اشاره شده سبب تغییر الگوی شیمیایی تخمیر میکروبی می شود.

جدول ۴-۳ تولید متان و هیدروژن در تغییر توازن تخمیر.

نوع خوراک	توضیحات
خوراک حاوی غلات فراوان	گلوکز← (۲) استات + (۲) دی اکسید کربن + (۸) هیدروژن
	گلوکز← (۲) پروپیونات + (۲) اکسیژن
	گلوکز← بوتیرات + (۲) دی اکسید کربن + (۴) هیدروژن
	دی اکسید کربن + (۸) هیدروژن← متان+ (۲) آب
	(۳) گلوکز← (۲) استات + بوتیرات + (۲) پروپیونات + (۳) دی اکسید کربن + متان + (۲) آب
توازن تخمیر	**استات : پروپیونات = ۱ و متان : گلوکز = ۰/۳۳**
خوراک حاوی علوفه فراوان	(۳)گلوکز← (۶) استات + (۶) دی اکسید کربن + (۲۴) هیدروژن
	گلوکز← (۲) پروپیونات + (۲) اکسیژن
	گلوکز← بوتیرات + (۲) دی اکسید کربن + (۴) هیدروژن
	(۳) دی اکسید کربن + (۲۴) هیدروژن← (۳) متان+ (۶) آب
	(۵) گلوکز← (۶) استات + بوتیرات + (۲) پروپیونات + (۵) دی اکسید کربن + (۳) متان + (۶) آب
توازن تخمیر	**استات : پروپیونات = ۳ و متان : گلوکز = ۰/٦۰**

الگوی شیمیایی تخمیر می تواند با تغییر مقدار اسیدهای چرب فرار و نسبت های بین آنها بواسط تغییر اسیدیته شکمبه مسیر ویژه هضم و جذب نیتروژن و سنتز پروتئین میکروبی را در شکمبه تغییر دهد. بطور مثال؛ الگوی شیمیایی تخمیر می تواند بجای سنتز اسیدآمینه ها از پروتئین های مصرفی مبادرت به سنتز اسیدهای چرب فرار بخصوص نوع شاخه دار که برای رشد میکروارگانیسم ها حیاتی می باشند، نماید. از آنجا که نیتروژن از تجزیه دو منبع پروتئینی و غیر پروتئینی حاصل می شود (شکل ۷-۲)، لذا هر عاملی که سبب تغییر روند تجزیه نیتروژن شود، می تواند الگوی شیمیایی را تغییر دهد.

افزایش اسیدهای چرب فرار بخصوص اسید پروپیونیک و اسید لاکتیک سبب تشکیل یون آمونیوم از آمونیاک شده (به دلیل افزایش اسیدیته) و نیتروژن موجود را از چرخه های سنتز پروتئین میکروبی دور نگاه می دارد. اسیدیته شکمبه با تغییر آمونیاک به آمونیوم سبب کاهش جذب نیتروژن اضافی از دیواره شکمبه و افزایش نرخ عبور آن می شود. لذا الگوی شیمیایی تخمیر علاوه بر آنکه می تواند بواسط افزایش یون آمونیوم یا غلظت آمونیاک تغییر کند، بلکه توسط تغییرات اسیدیته، انرژی قابل دسترس و نرخ عبور تغییرات مداومی را در تخمیر نیتروژن ایجاد نماید. بطور مثال؛ کمبود انرژی سبب تغییر تعادل نیتروژن به انرژی جهت ساخت پروتئین میکروبی شده و پروتئین اضافی توسط الگوی شیمیایی تخمیر در چرخه انرژی زایی مصرف می گردد و یا توسط افزایش نرخ عبور از تولید آمونیاک جلوگیری می نماید. در چرخه انرژی زایی ابتدا اسیدهای آمینه دی آمینه شده و تولید آلفا کتوگلوتارات می کنند. آلفاکتوگلوتارات کلید ورودی مسیر انرژی زایی، ساخت اسیدهای چرب فرار و سایر اسیدهای آمینه در شکمبه می باشد (شکل ۱۵-۳).



شکل ۱۵-۳ الگوی شیمیایی تخمیر پروتئین جهت سنتز اسیدهای چرب فرار و انرژی.

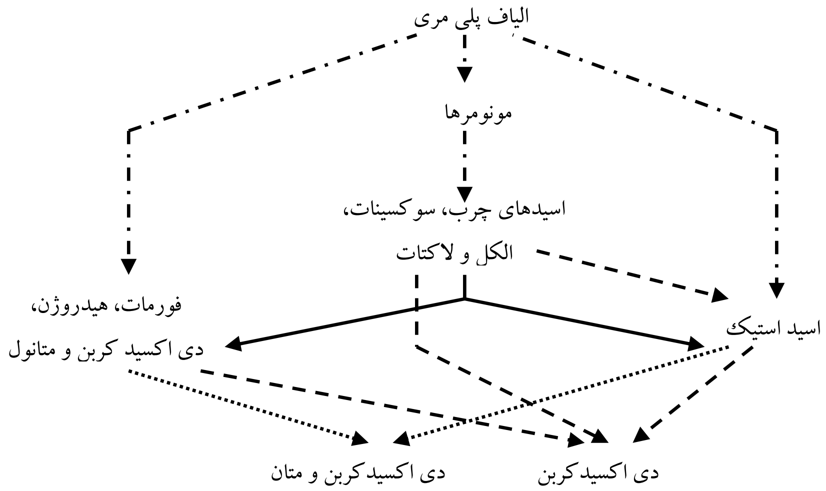
الگوی شیمیایی تخمیر علاوه بر موارد اشاره شده، توسط نوع نیتروژن ورودی در جیره می تواند تغییر کند. بدین صورت که افزایش نسبت پروتئین حقیقی به پروتئین غیر حقیقی (NPN) سبب تغییر نوع الگوی شیمیایی تخمیر از حالت اسید استیکی (هضم الیاف) به پروپیونیکی (هضم غلات یا نشاسته) می گردد. همچنین آزمایشات نشان داده است که افزایش پروتئین غیر حقیقی جیره سبب بیشتر شدن تولیدات تجمعی اسیدهای چرب فرار می شود. لذا جهت تغییر الگوی شیمیایی تخمیر اسیدهای چرب فرار می توان از نوع نیتروژن موجود در جیره استفاده کرد.

سومین فاکتور موثر در تغییر روند الگوی شیمیایی تخمیر مصرف هیدروژن و تولید گازهای تخمیری می باشد. کارشناسان سه مسیر کلی جهت مصرف هیدروژن اضافی شکمبه پیشنهاد نموده اند که شامل (۱) اشباع کردن اسیدهای چرب غیر اشباع، (۲) تولید پروپیونات و (۳) تولید متان می باشد. از آنجا که حداکثر هیدروژن صرف شده جهت اشباع اسیدهای چرب غیر اشباع بیش از ۱۰ درصد کل هیدروژن تولیدی شکمبه نمی باشد، لذا عدم حضور آنها در محیط شکمبه اثر چندانی بر الگوی تخمیر ایجاد نمی نماید. اما یادآور می شویم که ازدیاد بی رویه اسیدهای چرب بخصوص نوع سیس در مقابل ترانس آن سبب تغییر الگوی شیمیایی تخمیر شده و تخمیر را کاهش می دهد. اسیدهای چرب مصرفی می توانند با کپسولی کردن مواد مغذی آنها را از دسترس میکروب ها خارج کرده و تخمیر را کاهش دهند. بطور مثال؛ افزایش اسیدهای چرب بلند زنجیره سبب توقف فعالیت باکتری های متان زا (به دلیل مصرف هیدروژن مورد نیاز آنها) و فیبرولایتیک می شود. ولی باید در نظر داشت که باکتری های گرم منفی به دلیل لایه لیپوپروتئینی و لیپوپلی ساکاریدی دیواره سلولی آنها حساسیت کمتری نسبت به اسیدهای چرب در مقابل باکتری های گرم مثبت دارند. اسیدچرب با تغییر الگوی شیمیایی تخمیر مسیر تخمیر شکمبه ای را به تولید کمتر استات و بوتیرات و افزایش پروپیونات سوق می دهد. به تبع فقدان بوتیرات فعالیت پروتوزوئری کاهش و الگوی شیمیایی تخمیر دگرگون می گردد.

تولید اسید پروپیونیک هم می تواند هیدروژن تولید شده در شکمبه را براساس تامین کوآنزیم NADH مصرف نماید (شکل ۱۲-۳). اما از آنجا که فعالیت اسید پروپیونیک کاهش تولید اسید استیک را در پی خواهد داشت و از طرف دیگر در طی روند تولید اسید پروپیونیک قدرت کاهش یا حذف دی اکسید کربن تولیدی هم در شکمبه وجود ندارد، لذا الگوی شیمیایی تخمیر روند تولید متان را جهت حذف هیدروژن بکار می گیرد. همچنین در هنگام مصرف خوراک علوفه ایی، استات بیشتری در مقابل پروپیونات تولید می گردد که در اجرای این فرآیند دی اکسید کربن (بیش از ۶۰ درصد گازهای شکمبه) و هیدروژن بالاتری هم آزاد می شود. گاز دی اکسید کربن که از دی کربوکسیلاسیون تخمیر و خنثی سازی هیدروژن توسط یون اسیدکربونیک حاصل می شود، بیشترین گاز تولیدی در شکمبه را

شامل می شود که همراه با فورمات و در طی روند تولید متان مورد مصرف باکتری های متان زا قرار می گیرد (شکل ۱۶-۳). لذا در صورت بکارگیری خوراک علوفه ای الگوی شیمیایی تخمیر خود را ملزم به اجرای برنامه تولید متان می نماید که در اثر غالب شدن دی اکسید کربن در رقابت با اسید پروپیونیک بوجود می آید.

اگر چه مسیرهای متعددی در روند شیمیایی تخمیر دخالت می کنند و این مسیرها تعیین کننده الگوی های شیمیایی تخمیر هستند، اما به دلیل پیچیده بودن شرایط تخمیر و ضعف لوازم مربوط به شناسایی کنترل همه آنها توسط کارشناسان مقدور نمی باشد. لذا امروزه اساسی ترین روندهای موثر در الگوی شیمیایی تخمیر را تولید و نسبت های اسیدهای چرب فرار، آمونیاک، چربی ها و اسیدهای چرب آنها، متان و گازهای تولیدی می دانند که می تواند با پیشرفت علوم و تجهیزات آزمایشگاهی تغییرات شگرفی در این زمینه ایجاد گردد. ولی با شناخت جزئی تر فرآیندهای اصلی و فرعی (کنترلی) تخمیر می توان الگوی شیمیایی تخمیر را به صورت دلخواه و مطلوب در روندهای بی هوازی تغییر داد.



شکل ۱۶-۳ الگوی شیمیایی تخمیر و تولید گاز در شکمبه. نقطه چین سنتز متان، خط چین احیا کننده سولفات، خط کامل تخمیر ثانویه و خط نقط چین تخمیر اولیه را نشان می دهد.

۳-۴-۳ عوامل بحران در تخمیر شکمبه

ثبات الگوی فیزیکی و شیمیایی تخمیر شکمبه وابسته به فعالیت مداوم و مناسب میکروارگانیسم ها بر روی مواد مغذی مصرفی می باشد. اختلال در هر یک از مسیرهای بیوشیمیایی تخمیر سبب تغییر نامطلوب محیط شکمبه و توقف کامل فعالیت های آن می شود. مهمترین عواملی که می تواند الگوی فیزیکی و شیمیایی تخمیر را تهدید نماید عبارتنداز (۱) اسیدوز، (۲) نفخ، (۳) مسمومیت های عناصر

غذایی و نهایتا (۴) تغییرات ظاهری دستگاه گوارش می باشد. موارد مذکور علاوه بر تغییر و یا قطع الگوی فیزیکی و شیمیایی تخمیر بر دستکاری های شکمبه ای اثر مستقیم گذاشته و آن را دچار تغییرات اساسی می کند.

۳-۴-۳-۱ اسیدوز

اسیدوز که ناشی از مصرف بیش از حد کربوهیدرات سریع التخمیر و نشاسته بوجود می آید، شامل یک کاهش در قدرت قلیایی محتویات شکمبه نسبت به یون هیدروژن و یا اسیدهای مصرفی می باشد. اسیدوز در شکمبه به دو حالت تحت بالینی و بالینی دیده می شود که بالینی آن بر اثر تجمع اسید لاکتیک و سایر اسیدهای چرب فرار تولید شده از کربوهیدرات های سریع التخمیر حاصل می شود. نوع تحت بالینی آن به دلیل کاهش عملکرد شکمبه و نبود علامت های ظاهری اسیدوز خطرناکتر محسوب می گردد. شدت اسیدوز شکمبه ای به میزان و نوع عمل آوری مواد مغذی (حرارت یا فشار)، کاهش اندازه ذرات و انبارداری غلات با رطوبت زیاد (رطوبت بالا سبب افزایش تجزیه پذیری نشاسته می گردد) وابسته می باشد. همچنین، اسیدوز شکمبه ارتباط مستقیمی با گلوکز آزاد در شکمبه دارد و سبب ازدیاد باکتری استرپتوکوکوس بوویس (عامل اسیدوز لاکتیکی)، کلی فرم ها (عامل جدا کننده کربوکسیل از اسیدآمینه و تشکیل آندوتوکسین ها یا آمیدها) و افزایش اسمولالیته محتویات شکمبه (عامل اصلی جلوگیری از جذب اسیدهای چرب فرار شکمبه از دیواره) می شود. اما با افزایش کربوهیدرات های ساختاری و یا افزایش مواد خشبی جیره (جهت افزایش مدت زمان نشخوار و تولید بزاق بافری توسط افزایش اندازه ذرات)، افزایش تعداد دفعات خوراک دهی و مصرف خوراک بصورت تجمعی یا مخلوط شده، کاهش نوسان زیاد در مقدار مصرف خوراک، بکارگیری مواد تامپونی (بی کربنات ها و یا اوره) پروبیوتیکی (لاکتوباسیلای) و یونفری (موننسین، ترروناسین، ویرجینیامایسین، سالینومایسین، تیوپپتین و لاسالوسید)، کاهش فشار اسمزی شکمبه با مصرف آب، افزایش فعالیت پروتوزوئری و کنترل فعالیت استرپتوکوکوس بوویس و لاکتوباسیلوس عامل های تولید لاکتات می توان از بروز اسیدوز جلوگیری و تخمیر را پایدارتر کرد. با تلقیح باکتری مگاسفرا السدنی، گونه های رومینانتیوم و اسیدوفیلوس می توان مصرف لاکتات را در شکمبه جهت کنترل اسیدیته افزایش داد، اما به دلیل پیچیده بودن اکوسیستم میکروبی شکمبه و شرایط رفتاری غیرمترقبه میکروب ها، کنترل دراز مدت در این زمینه مشکل است. اسیدوز علاوه بر تغییر الگوی شیمیایی تخمیر، الگوی فیزیکی آن را با توقف حرکات شکمبه-نگاری جهت مخلوط کردن غذا در شکمبه و نشخوار تغییر می دهد. از آنجا که نیمی از بافرهای کنترل اسیدیته از بزاق حاصل می شود، تغییر یا توقف الگوی فیزیکی تخمیر با اسیدوز حاد همراه خواهد شد و سبب شدت بیشتر این عارضه و اختلال آن در دستکاری میکروفلور شکمبه می شود.

۲-۳-۴-۳ نفخ

نفخ دومین عارضه نامطلوب در محیط شکمبه محسوب می شود که می تواند الگوهای شیمیایی و فیزیکی تخمیر را به شدت تغییر و یا متوقف نماید. وقوع نفخ احتمالا به پنج عامل عمده منطقه یا اقلیم جغرافیایی، نحوه انبارداری اقلام غذایی، ترکیب کمی و کیفی جیره، فعالیت های میکروبی و نوع دام نشخوارکننده وابسته می باشد. به دلیل آنکه مهمترین ضرر نفخ در الگوی تخمیری شکمبه توقف کامل فعالیت های میکروبی می باشد، لذا کنترل آن برای دستکاری مطلوب فلور میکروبی شکمبه اهمیت بسزایی دارد. از آنجا که نفخ به دو صورت گازی و کفی مشاهده می شود، بروز هر یک از آنها می تواند شرایط خاص محیطی را بوجود آورد. با این وجود هر عاملی که بتواند فعالیت های طبیعی شکمبه اعم از حرکت یا تخمیر را متوقف نماید، می تواند عارضه نفخ را افزایش دهد. بطور مثال؛ انسداد، تغییر شکل دستگاه گوارش همراه با التهاب، افزایش اسیدیته شکمبه، مصرف مواد کف زا (ساپونین)، افزایش ویسکوزیته یا کشش سطحی شکمبه (ناشی از حضور موکوپلی ساکاریدها یا لعاب به دلیل فعالیت های میکروبی)، دمای نامطلوب شکمبه، فقدان تعادل در جمعیت های میکروبی و نرخ عبور آهسته می توانند زمینه بروز نفخ را در شکمبه توسعه دهند. اما از آنجا که نفخ شامل تراکم زیاد گاز در شکمبه است، اولین عامل کنترلی آن بکار انداختن توالی آروغ و جلوگیری از تجمع گاز در شکمبه می باشد. کارشناسان عامل اصلی نفخ گازی را انسداد، تغییر شکل ظاهری دستگاه گوارش و التهاب دستگاه می دانند که وابسته به الگوی فیزیکی تخمیر است، در حالی که در نفخ کفی نحوه فعالیت میکروب ها بر روی مواد مغذی عامل اصلی محسوب می شود. کارشناسان یک اختلاف اساسی در تعداد و تنوع میکروبی مرتبط با نفخ کفی نشان داده اند که بیان کننده عدم فعالیت یک میکروارگانیسم خاص در تولید نفخ کفی می باشد. اما گزارشات نشان می دهد که حضور بیشتر میکروب های گرم منفی مانند گونه های کوکوس و باسیلوس احتمال فرضیه نفخ توسط آنها را بیشتر کرده است.

جهت کنترل نفخ براساس نوع بروز آن می توان از روش های مختلفی استفاده کرد که مهمترین آنها شامل: فرآوری های فیزیکی و شیمیایی مواد غذایی، کنترل نسبت های اقلام مصرفی، استفاده از مواد ضد نفخ (یونفرها و پروبیوتیک ها)، بکاربردن آنزیم های هضمی (دکستراناز)، کاهش ویسکوزیته محتویات شکمبه با دترجنت ها (پلورونیکس یا پلوکسالین)، استفاده از مخمر، تحریک بزاق جهت ترشح مواد بافری، کنترل عناصر معدنی و محلولیت پروتئینی جیره است. مواد معدنی کاتیونی مانند سدیم می تواند تراکم ذرات کلوئیدی موجود در محتویات شکمبه را کاهش داده و زمینه بروز نفخ را کاهش دهد. اما افزایش یون های کلسیم، منیزیوم و پتاسیم جیره سبب بروز ذرات کلوئیدی و نفخ کفی می شوند.

۳-۳-۴-۳ مسمومیت عناصر غذایی

از آنجا که گیاهان دارای تنوعات شیمیایی خاص هستند، می توانند اثرات متفاوتی را در شکمبه از خود به جای بگذارند. تاثیراتی که در غالب مسمومیت عناصر غذایی بحث می شود شامل سه بخش کلی است: (۱) دسته موادی که فقط بر روی عملکرد دام اثر می گذارند، (۲) موادی که فقط بر گونه های میکروبی اثر گذاشته و باعث حذف و یا توسعه یک گونه میکروارگانیسمی می شوند و (۳) دسته موادی که هم بر دام و هم بر گونه میکروبی شکمبه اثر می گذارند. مسمومیت ها زمانی مورد توجه قرار می گیرند که عوارض ثانویه آن یعنی کاهش عملکرد دام، اسهال و نفخ، عفونت های گوارشی و مرگ و میر آشکار شده باشد. در این حالت وضعیت فلور میکروبی شکمبه به شدت تخریب و امکان بازسازی آن سخت می باشد. اگر چه مسمومیت دام ها می تواند یک طیف وسیعی از مواد را شامل شود، اما مهمترین مسمومیت هایی که سبب تغییر فلور میکروبی شکمبه می شوند شامل مسمومیت فنیل پروپانوئیدها (لیگنین، فلاوون ها، کومارین ها، ایزوفلاوون ها و تانن ها)، مواد نیتروژن دار آلکالوئیدی و یا ترپنوئیدی، لیپوفیلیک ترپن ها (ساپونین ها، لاتکس، کائوچو و استروئیدها)، لیپیدهای محدود کننده (کوتین ها، واکس ها و سوبرین ها)، محدود کننده های پروتئازی (لکتین ها و هموگلوتنین ها)، سیلیکاها که در غالب محصولات بیوژنیک هستند، می باشد. در حالت چرای آزاد همواره مشکلات فوق ظاهر می شود که برای این سم زدایی یک دسته اصول اکولوژیکی وجود دارد که شامل: (۱) بهره گیری از عامل های سمی بعنوان منابع انرژی و انتقال الکترون، (۲) بهره گیری از لوازم فرآوری و سم زدا و (۳) سم زدایی توسط خود میکروارگانیسم ها می باشد. در جهت سم زدایی استفاده از سه مسیر به صورت همزمان مناسب تر خواهد بود، اما در صورت امکان عادت دادن میکروب ها و برقراری حالت شماره ۱ سم زدایی بهترین روش محسوب می شود.

گزارش ها حاکی از آن است که حذف یا رشد یک گونه خاص میکروبی تحت اثر سموم غذایی می تواند فلور میکروبی را دگرگون سازد. بطور مثال؛ سم میموزین از گیاه لئوکانئالئوسفالا می تواند فعالیت میکروبی را در غیبت باکتری *Synergistes jonesii* متوقف نماید. و یا آرابینوگالاکتون ساختاری موجود در برگ های گیاه گون می تواند از چسبیدن باکتری های سلولایتیک به سلولز جلوگیری و الگوی شیمیایی تخمیر را دگرگون نماید. و یا آلکالوئیدها دسته مواد نیتروژن دار هتروساکلیک هستند که باعث تغییر شدید فلور میکروبی شکمبه و حتی توقف تخمیر می شوند. این دسته مواد می توانند در گراس هاس زراعی مانند علف قناری (ماده عامل ایندول آلکیلامین) و فسکیو (ماده عامل پرلولاین) وجود داشته باشند. اما مهمترین ماده شیمیایی موثر بر اکولوژی شکمبه لیگنین ها و تانن ها هستند که الگوی شیمیایی و فیزیکی تخمیر را به شدت دگرگون می کنند. بطور مثال؛ ازدیاد

تانن ها و لیگنین ها می تواند فعالیت باکتری های سلولایتیک را متوقف و الگوی شیمیایی تخمیر را تغییر دهند.

همچنین استفاده از عناصر معدنی به صورت نامطلوب می تواند بروز مسمومیت های تخمیری را افزایش دهد. بطور مثال؛ بیش بود سولفور در شکمبه سبب کاهش فعالیت باکتری های سلولایتیک و حتی آمیلولایتیک و افزایش گاز سولفید هیدروژن و افزایش نفخ می شود. و یا بیش بود ترکیبات عناصری سنگین مانند آرسنیک و قلع می تواند الگوی شیمیایی تخمیر را کندتر نموده و الگوی فیزیکی تخمیر را متوقف نمایند.

۳-۴-۳-۴ تغییرات ظاهری دستگاه گوارش

تغییرات ظاهری دستگاه گوارش مانند انسداد، جابجایی شیردان و یا سایر موارد می تواند موجب اختلالاتی در متابولیسم ایجاد و سبب استرس و حتی توقف فعالیت های گوارشی میکروبی شود. علت شناسی این مسئله نشان می دهد که نژاد و توارث، زایمان های سخت، فصل و شرایط نامساعد در آن، تغذیه ناصحیح مواد متراکم در حد بالا و حالات پرورشی بسته، انسداد ناشی از خوراک غیرمتعارف و بزرگ و بیماری های همزمان اختلالات گوارشی مهمترین عوامل تغییر شکل ظاهری دستگاه گوارش می باشد. در این حالت جریان مواد غذایی در دستگاه گوارش مختل شده و نرخ عبور و میزان مصرف مواد غذایی بشدت کاسته می شود. در این حالت به دلیل تغییر شدید الگوی فیزیکی تخمیر و توقف آن الگوی شیمیایی تخمیر هم کاهش و به حد صفر تمایل پیدا می کند. افزایش بیش از اندازه مواد متراکم در جیره مصرفی سبب افزایش اسیدهای چرب فرار و کاهش حرکات دستگاه گوارش به خصوص شکمبه، نگاری، هزارلا و شیردان می شود. در این شرایط دام مستعد به بروز تغییرات ظاهری دستگاه گوارش مانند جابجایی شیردان می شود.

۳-۵ برای مطالعه بیشتر

- خادم. ع. ا.، شریفی، م. (۱۳۸۹). اصول علمی و عملی پرورش گاوهای گوشتی. تالیف. انتشارات دانش نگار. تهران.
- قربانی. غ. ر. (۱۳۸۱). ناهنجاری های متابولیکی در گاو. تالیف. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان.
- مهدی طباطبایی. م. (۱۳۸۲). جنبه های فیزیولوژی تغذیه نشخوارکنندگان. ترجمه. انتشارات بوعلی سینا. همدان.

- منصوری. ه.، نیکخواه. ع.، میرهادی. ا.، رضائیان. م. (۱۳۸۵). مقایسه جمعیت میکروبی شکمبه با مصرف علوفه خشبی در گاوهای سیستانی و هولشتاین. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۷۲.

- Allen, M. S. (1997). Relationship between fermentation acid productions in the rumen and the requirement for physically effective fiber. J. Dairy Sci. 80:1447–1462.
- Allen, G. (1998). Polymerase chain reaction techniques for the study of rumen bacterial ecology and biotechnology. PhD Thesis, University of New England, Armidale. NSW.
- Allison, M. J. (1970). Nitrogen metabolism in rumen microorganisms. In Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. A. T. Phillipson, ed. Oriel, Newcastle upon Tyne, England.
- Apajalahti, J. (2005).Comparative gut micro flora, metabolic challenges, and potential opportunities. J. Appl. Poult. Res. 14:444–453.
- Argyle, J. L., R. L. Baldwin. (1988). Modeling of rumen water kinetics and effects of rumen pH changes. J. Dairy Sci. 71:1178.
- Armentano. L. E., J. W. Young. (1983). Production and metabolism of volatile fatty acids, glucose and CO2 in steers and the effects of monensin on volatile fatty acid kinetics. J. Dairy Sci. 64, (Suppl. 1). 131 (abs.).
- Bauman, D. E., C. L. Davis, H. F. Bucholtz. (1971).Propionate Production in the Rumen of Cows Fed Either a Control or High-Grain, Low-Fiber Diet. J. Dairy Sci. Vol. 54: 1- 9.
- Calsamiglia, S., A. Ferret, M. Devant. (2002). Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. Journal of Dairy Science, 85, 574-579.
- Cole, N. A., T. H. Camp, L. D. Rowe, D. G. Stevens, D. P. Hutcheson. (1988). Effect of transport on feeder calves. Am. J. Vet. Res. 49:178.
- Dehority, B. A. (2003). Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Dehority, B. A., P. A. Tirabasso, and A. P. Grifo. (1989). Most probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. Appl. Environ. Microbial. 55:2789.
- Dohme, F., A. Machmüller, A. Wasserfallen, M. Kreuzer. (2001). Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. Environmental Microbiology. 32: 47-51.

- Firkins, J. L., Z. Yu. (2005). Characterization and quantification of the microbial populations of the rumen. BioTechniques. 36: 808-812.
- Fluharty, F. L., S. C. Loerch, B. A. Dehority. (1994). Ruminal characteristics, microbial populations, and digestive capabilities of newly weaned, stressed calves. J. Animal Sci. 72: 2969-2979.
- Fonty, G., P. Gouet, J. P. Jouany, J. Senaud. (1987). Establishment of the Micro flora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. J. Gen. Microbiology. 133: 1835-1843.
- Goldman, N. (1996). Phylogenetic estimation. In: Bishop, M. J., C. J. Rawling (eds) DNA and Protein Sequence Analysis. IRL Press, Oxford, U.K., pp. 279-312.
- Gregg, K., G. Allen, T. Bauchop, A. Klieve, M. Lincoln. (1993). Practical genetic engineering of rumen bacteria. Animal Nutrition in Australia. (Ed. D.J. Farrell) pp 13-21. University of New England, Armidale, NSW, Australia.
- Herrera-Saldana, R., R. Gomez-Alarcon, M. Torabi., J. T. Huber. (1990). Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. J. Dairy Sci. 73:142.
- Hristov, A. N., M. Ivan, L. M. Rode, T. A. McAllister. (2001). Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. J. Animal Sci. 79: 515-524.
- Kamra, D. N. (2005). Rumen microbial ecosystem. Current Sci. VOL. 89: 124-136.
- Koike, S. & Y. Kobayashi. (2001). Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus and Ruminococcus flavefaciens. FEMS Microbiolology Letters, 204, 361-366.
- Margaret, J. E. (1962).The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. J. Gen. Microbial. 29: 563-578.
- McPherson, M. J., S. G. Møller. (2006). PCR. Second Edition, Published by: Taylor & Francis Group, ISBN 0-203-00267-9.
- McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, K.-J. Cheng. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Animal Sci. 72: 3004-3018.
- Mourino, F., R. Akkarawongsa, P. J. Weimer. (2001). Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. J. Dairy Sci. 84: 848-859.

- Oldick, B. S., J. L. Firkins. (2000). Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. J. Animal Sci. 78: 2412-2420.
- Ørskov, E. R., W. P. Flatt, P. W. Moe. (1968). Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. J. Dairy Sci. 51: 1429.
- Rossello, R., R. Amann. (2001). The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews. 25: 39-67.
- Russell, J. B., R. B. Hespell. (1981). Microbial rumen fermentation. J. Dairy Sci. 64:1153-1169.
- Russell, J. B. (2002). Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca, N.Y.
- Slyter, L. L. (1976). Influence of acidosis on rumen function. J. Anim. Sci. 43:910.
- Terry, R. A., J. M. A. Tilley., G. E. Outen. (1969). Effect of pH on the cellulose digestion under in vitro conditions. J. Sci. Food Agric. 20:317.
- Towne, G., T. G. Nagaraja, R. C. Cochran, D. L. Harmon, C. E. Owensby, D. W. Kaufman. (1988). Comparisons of ruminal fermentation characteristics and microbial populations in bison and cattle. Applied and Environmental Microbiology, Vol: 54, pp: 2510-2514.
- Van Soest, P. J. (1994). Microbes in the gut. 2nd ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.
- Wallace, R. J. (1994). Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. J. Anim Sci. 72: 2992-3003.
- Warner, A. C. I. (1962). Some factors influencing the rurnen microbial population. J. gen. Microbial, Vol: 28, 129-146.
- Wolin, M. J. (1960). A theoretical rumen fermentation balance. J. Dairy Sci. 43:1452.

فصل چهارم

باکتری های شکمبه

۱-۴ تکنیک های باکتری شناسی	۱۴۳
۲-۴ کشت باکتری ها	۱۴۹
۳-۴ طبقه بندی باکتری های شکمبه	۱۵۹
۴-۴ فعالیت های حیاتی در باکتری ها	۱۸۵
۵-۴ مکانیسم اتصال و هضم باکتریایی	۱۹۰
۶-۴ جمعیت باکتری ها در شکبمه	۱۹۸
۷-۴ برای مطالعه بیشتر	۲۰۳

باکتری های شکمبه

نشخوارکنندگان برعکس سایر موجودات دارای سامانه هضم غذایی متفاوتی هستند. آنها پس از ورود خوراک به شکمبه اقدام به تخمیر مواد مغذی از طریق میکروارگانیسم های شکمبه به خصوص باکتری های می کنند. این میکروب ها سازنده گان اصلی پروتئین و عناصر غذایی قابل دسترس مانند ویتامین ها و اسیدهای چرب فرار می باشند. همانطور که قبلا اشاره گردید، میکروارگانیسم ها دائما با محیط بیرونی خود در تماس بوده و به شرایط جدید به سرعت عادت نموده تا شکمبه را همواره در حالت پویا قرار دهند. اولین بار در سال ۱۸۸۴ شخصی به نام ون تاپین به مطالعات باکتری های شکمبه پرداخت، اما از سال ۱۹۴۰ وقتی انگلیسی ها اهمیت اسیدهای چرب فرار تولید شده از تخمیر باکتریایی را بیان نمودند، کارشناسان به حیاتی بودن حضور میکروب ها به خصوص باکتری ها پی بردند. از آن زمان پیشرفت های شگرفی جهت شناسایی گونه های مختلف میکروبی و باکتریایی صورت گرفت. باکتری ها مهمترین میکروارگانیسم های موجود در شکمبه جهت هضم مواد مغذی می باشند. بیشتر باکتری های موجود در شکمبه بی هوازی اجباری بوده و تعداد کمی از آنها هوازی اختیاری هستند. کارشناسان باکتری ها را براساس ساختمان دیواره سلولی به گروه های گرم منفی، گرم مثبت و مایکوپلاسماها تقسیم می کنند. باکتری ها عموما به اشکال گرد و میله ای با اندازه کاملا متغیر دیده می شوند.

۴-۱ تکنیک های باکتری شناسی

ساکنین محیط زیستی شکمبه، یک تشکیلات پیچیده ای از گروه های مختلف میکروبی هستند که دارای ارتباط های مختلف زیستی مانند شکارگری، مشارکتی و غیره می باشند. برای تشخیص نوع باکتری ها شکمبه کارشناسان راه حل های متفاوتی ارائه داده اند که براساس ریخت شناسی (از طریق شکل ظاهری و ساختاری)، فعالیت های زیستی (ماده غذایی مورد مصرف، فعالیت هوازی یا غیر هوازی و نوع تولیدات تخمیری)، جمعیت تشکیل دهنده (غالب یا مغلوب بودن جمعیت و جمعیت های کم خاص)، تشکیل اسپور (هاگزایی) و ملکول های ژنتیکی (براساس ملکول های DNA، rRNA و توالی های نوکلوتیدی آنها در زیر واحد S ۱۶) صورت می گیرند. شناسایی باکتری ها این امکان را بوجود می آورد که بتوان عامل اصلی فعل و انفعالات شیمیایی شکمبه را مشخص و مراحل تغییر آنها (بصورت اجباری و اختیاری) را در دستکاری های طبیعی و مصنوعی کنترل نمود. براساس پیشرفت های بدست آمده در تکنیک های باکتری شناسی، کارشناسان تعداد گونه های باکتریایی موجود در شکمبه را ۲۰۰ گونه مختلف تخمین زده اند. این در حالی است که از سال ۱۹۵۳ تا سال ۱۹۶۱ طبق تحقیقات انجام شده

تنها ۲۲ جنس و ۶۳ گونه باکتریایی شناسایی شده بود. از تعداد باکتری های شناسـایی شـده ۱۶ جـنس و ۳۰ گونه از آنها در فرآیندهای متابولیسم مواد مغذی شکمبه بیشتر فعالیـت را از خـود نشـان داده انـد. بـا توسعه تکنیک های بی هوازی و شبیه سازی های مخازن تخمیر طبیعی محققین توانسته اند تعداد واقعـی گونه های باکتریایی را مشخص و آنها را در مسائل دستکاری های گونه میکروبی وارد نمایند.

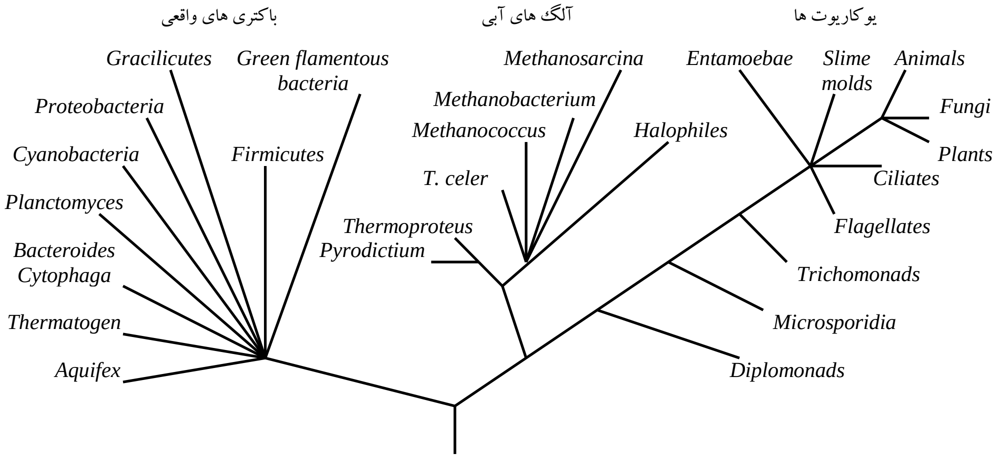
۴-۱-۱ شجره نویسی درختی باکتری ها

میکروارگانیسم های شکمبه از دسته پروتیست ها محسوب می شوند. پروتیست ها به دو بخش یوکاریوت ها (دارای هسته مشخص) و پروکاریوت ها (دارای هسته غیر مشخص) تقسیم می شوند. سلسله پروکاریوت ها خود به چهار خانواده تقسیم می شوند که شامل:

(۱) خانواده *Gracilicutes*؛ دارای دیواره سلولی ظریف و در رنگ آمیزی از نوع گرم منفی تبعیت می کنند. باکتری های *Spirochetes*، *Spiral and curved*، *Obligate anaerobes*، *Aerobic and anaerobic cocci*، *Rickettsias*، *Clamydias* و *Mycoplasmas* از این گروه محسوب می گردند.

(۲) خانواده *Firmicutes*؛ دارای دیواره سلولی ضخیم بوده و در هنگام رنگ آمیزی از نوع گرم مثبت پیروی می کنند. باکتری های *Cocci*، *Endospore-forming rods*، *Mycobacteria* و *nonfilamentous actionomycetes* در این گروه جای می گیرند.

(۳) خانواده *Tenericutes*؛ دارای دیواره سلولی نرم و انعطاف پذیر بوده و (۴) خانواده *Mendosicutes*؛ که فاقد پپتیدگلایکان در دیواره سلولی خود می باشند. آلگ های سبز-آبی (*Archaeobacteria*) در خانواده چهارم قرار می گیرند. این نوع طبقه بندی جهت شجره نویسی درختی براساس روش Bergey's manual در سال ۱۹۸۴ طراحی و در سال ۱۹۹۴ تصحیح شده است. براساس تکنیک شجره نویسی درختی محققین توانسته اند پنج هزار گونه باکتریایی را شناسایی و آنها را طبقه بندی نمایند. در شجره درختی که توسط روش تفکیک ژنتیکی طراحی می شود، ارگانیسم های تک یاخته ای به سه سلسله باکتری های واقعی، آلگ ها و یوکاریوت ها تقسیم می شوند (شکل ۱-۴). در این طبقه بندی باکتری های واقعی و آلگ ها که در مجموع پروکاریوت نامیده می شود، براساس خاصیت های ظاهری مانند ریخت شناسی (کروی، میله ای و غیره)، نوع رنگ آمیزی، اندازه باکتری، وضعیت حرکتی، ساختار ضمیمه (به شکل هاگ، دارای غلاف و یا عدم غلاف پوششی و سایر بخش های دیگر) و فعالیت های زیستی (بی هوازی یا هوازی بودن فعالیت، فتوسنتز کننده، تولید کننده متان و سایر موارد) تقسیم شدند.



شکل ۱-٤ بخشی از شجره زیستی باکتری ها براساس طبقه بندی درختی Bergey's manual.

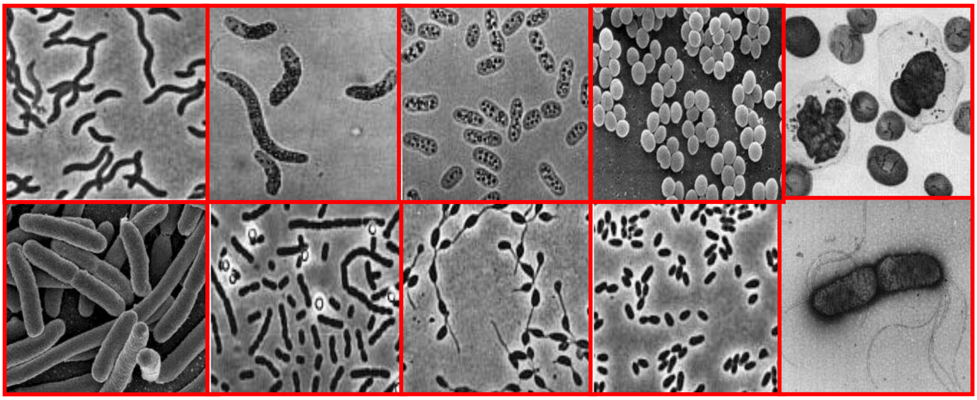
۲-۱-۴ ریخت شناسی و ساختار باکتریایی

یکی از روش های اولیه جهت طبقه بندی باکتری ها شناسایی ظاهر و وضعیت ساختمانی باکتری می باشد. اگر چه این نوع طبقه بندی دارای اشکالات خاص خود می باشد، اما هنوز به صورت گسترده مورد استفاده قرار می گیرد. باکتری ها به شکل های مختلفی رشد و نمایان می شوند، اما هر ارگانیسم دارای یک شکل ویژه بصورت کروی، میله ایی کوتاه و بلند، زنجیره ایی-کروی، زنجیره ایی- میله ایی، دارای تاژک و یا مژک، دارای غلاف و یا پوشش های مختلف، کروی متمایل به میله ایی (بیضی شکل)، رشته ای پیچیده، میله ای با سر یا انتهای برجسته و هلالی یا صاف (بدون انحناء) می باشد (شکل ۲-۴). همچنین اندازه باکتری ها می تواند در شناسایی باکتری مثمر ثمر بوده و اندازه آنها بین ۰/۳ تا ۵۰ میکرومتر متفاوت خواهد بود. البته اشکال ظاهری براساس سن باکتری ها متفاوت می گردد. بطور مثال؛ باکتری فیبروباکترسوکسینوژنز در کشت های جوان دارای اشکال متفاوت بوده اما با افزایش سن کشت به شکل کروی متورم شده دیده می شوند.

کلونی باکتری ها می تواند براساس مواد مصرفی، رنگدانه های موجود در ساختار یاخته و یا ماده ژلاتینی لزج اطراف باکتری به صورت زرد، سفید، نارنجی، سبز، آبی و حتی رنگ های سرخ تا قهوه ای را از خود بروز دهند. شکل کلونی ها هم براساس دسترسی به مواد مغذی، درجه حرارت، حضور یا عدم حضور اکسیژن و عمق نفوذ به مواد مغذی متفاوت و عمدتا به شکل توده ایی، ستاره ایی، گرد، رشته ایی گسترده و دایره ایی نامتوازن دیده می شود.

- **هسته ژنتیکی و سیتوپلاسم یاخته**

باکتری ها همانند سایر یاخته های زیستی دارای یک بخش ژنتیکی می باشند. هسته ژنتیکی آنها را میتوان بعد از رنگ آمیزی اختصاصی با میکروسکوپ نوری مشاهده کرد. در مقایسه با یاخته های عالی مواد ژنتیکی باکتری ها و سایر یاخته های پست، پراکنده، ساده و بدون پوشش و کروموزوم حلقوی است که غشای هسته در آن وجود ندارد. کروموزوم های منفرد با یک DNA و یا RNA پیچ خورده در این تک یاخته ها به مزوزوم فرورفته و در غشای سیتوپلاسمی چسبیده است.



شکل ۲-٤ اشکال مختلف باکتری های استخراج شده از شکمبه نشخوارکنندگان.

در سالهای اخیر پروتئین های شبیه هیستون در باکتری ها کشف شده اند که احتمالا نقش مشابه هیستون ها را در کروماتین های یاخته های یوکاریوت ایفا می‌کنند. همچنین در کنار هسته ژنتیکی یاخته بخش سیتوپلاسمی وجود دارد که بیش از ۵۰ درصد پروتئین یاخته در آن جای دارد. آنزیمهای متابولیسمی، راه های گلیکولیز و بسیاری از آنزیمهای چرخه کربس، انواع کاتالازها، دهیدروژنازها، و مواد حد واسط چرخه های متابولیکی در سیتوپلاسم قرار گرفته اند. روابط اتمی، یونی و الکترونی بین ترکیب های مختلف سیتوپلاسمی، با نظم خاص فعالیت های حیاتی باکتری را ظاهر می‌سازند.

- **دیواره یاخته و غشای سیتوپلاسمی**

باکتری ها دارای یک دیواره سلولی خاص با جنس پپتیدگلایکان و یا ساختمان مخصوص می باشند، که شکل باکتری متاثر از آن خواهد بود. اما این دیواره سلولی تنها شکل دهنده نبوده و باکتری را در برابر تغییرات اسمولاریته شکمبه که منجر به تغییرات فشار اسمزی می شود، حفظ می نماید. دیواره یاخته فشاری معادل ۵ تا ۲۵ اتمسفر را نیز تحمل می کند. آن دسته از باکتری هایی که دارای غشای پپتیدگلایکان (موکوپپتید یا مورئین) ضخیم در دیواره سلولی خود می باشند و یا دارای ساختمان مخصوص با جنس اسید تایکوئیک هستند، در واکنش های رنگ آمیزی دچار تغییر رنگ شده و گرم مثبت تعریف می گردند. در حالیکه گرم منفی ها به دلیل عدم تغییر رنگ و ضعیف بودن حضور این

لایه در دیواره سلولی گرم منفی تعریف می شوند. باکتری های گرم منفی بجای غشای ضخیم پپتید گلایکان دارای دو لایه خارجی و داخلی دیگر همراه با ساختمان مخصوص از جنس غیر اسید تایکوئیک می باشند که باکتری را در برابر شرایط محیطی ایمن می کند. فضای ایجاد شده بین این دو لایه را پری پلاسمیک می گویند، که می تواند محل ذخیره سازی آنزیم های هاضم باشد. لذا باکتری های گرم مثبت به دلیل فقدان این پری پلاسمیک دارای آنزیم های خارج یاخته جهت هضم مواد مغذی خواهند بود.

دیواره سلولی باکتری ها بر روی یک غشای پلاسمایی قرار گرفته است که مسئول اصلی در نقل و انتقالات مواد مغذی در باکتری می باشد. پمپ های انتقال مواد در این غشاء تابع غلظت مواد مغذی و میزان انرژی دریافتی بوده و با توقف انها مرگ باکتری رقم خواهد خورد. غشای سیتوپلاسمی باکتری ها دارای جنس فسفولیپیدوپروتئین بوده و این غشا در پروکاریوت ها از یوکاریوت ها به علت نداشتن استرول متمایز می گردد. چین‌خوردگی های غشای سیتوپلاسمی به درون یاخته ساختار ویژه به نام مزوزوم را ایجاد می‌کند که کروموزوم های باکتری به آن متصل می گردد. این بخش در باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی بیشتر، بزرگتر و عمیق تر است. این بخش به دو شکل یعنی مزوزوم میانی (*Septal*) و مزوزوم جانبی (*Lateral*) دیده می شود. مزوزوم در تشکیل دیواره اسپور، تنفس سلولی و تقسیم باکتری شرکت دارد.

- **کپسول و لعاب باکتریایی**

ساختار دیگری که در باکتری ها قابل مشاهده است، کپسول و لعاب اطراف آن می باشد. باکتریهای کپسول دار در محیط جامد، کلونی های مخاطی (*Mucoid*) و صاف (*Smooth*) را می‌سازند. در مقابل باکتریهای فاقد کپسول کلونی های خشن (*Rough*) را تولید می کنند. خارجی ترین لایه باکتری ها کپسول نام دارد که در اکثر موارد از جنس پلی ساکارید ساخته می شوند. البته کپسول هایی از جنس اسید هیالورونیک (استرپتوکوکوس پیوژنز) و پلی پپتیدی (باسیلوس آنتراسیس) نیز وجود دارند. کپسول را می توان با استفاده از مرکب چین یا کریستال ویوله ۰/۱٪ رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مشاهده کرد. در صورتیکه این لایه خارجی از جنس پلی ساکارید باشد و به صورت سست اطراف باکتری را دربر بگیرد، به آن لایه لزج یا سست (*lime layer*) می گویند. چنانچه این بخش بسیار نازک و ظریف باشد با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده نیست و می توان از میکروسکوپ الکترونی استفاده کرد که به این بخش میکروکپسول یا گلایکوکالیکس می گویند. مهمترین اعمالی که کپسول برعهده می گیرد شامل خاصیت آنتی ژنیک، اتصال باکتری به سطوح مواد مغذی، تیپ بندی باکتری و ممانعت از خورده شدن باکتری توسط یاخته های دفاعی بیگانه خوار می باشد. همچنین، تمامی باکتری های

شکمبه را یک ماده پلی ساکاریدی سست و لزجی به نام لعاب در بر می گیرد که سبب حمایت باکتری در برابر حملات شکارگری سایر تک یاخته ها و تغییرات محیطی مانند خشکی مخزن می شود. فقدان این ماده سبب کاهش کلونی های باکتری و شسته شدن سریعتر باکتری از شکمبه به دلیل عدم اتصال باکتری به سایر مواد مغذی وارد شده و دیواره شکمبه می گردد.

- **ضمائم یاخته**

باکتری ها دارای یکسری مژک های ریز ریشه ایی (*Fimberia*) یا پیلی (*Pilli*) هستند که می تواند یاخته میکروبی را جهت اتصال به مواد مغذی یا سایر باکتری های دیگر جهت تشکیل کلونی یاری نمایند. این رشته های نازک و کوتاه شبیه مو و به اندازه ۰/۰۰۴ تا ۰/۰۰۸ میکرون هستند. این رشته‌ها در غشای پلاسمایی یاخته میکروبی لنگر می‌اندازد و به دو صورت کانال جنسی و معمولی اعمال وظیفه می کنند. اما تنها تعداد خاصی از گونه های باکتری وجود دارد که در سطح آنها تاژک (*Flagella*) دیده می شود. این تاژک ها رشته های پروتئینی به طول و قطر یکنواخت می‌باشند، که موجب تحرک باکتری شبیه به شنای سریع و مستقل می‌گردند. تاژک ها از سه قسمت رشته (*Filament*)، قلاب (*Hook*) و جسم پایه (*Basal*) تشکیل شده اند که براساس جایگاه آنها به چهار بخش یک تاژک در قطب یاخته (*Monotrichous*)، در هر باکتری یک تاژک (*Amphitrichous*)، یک دسته تاژک در یک یا دو طرف باکتری (*Lophotrichous*) و تاژک های نابجا در پیرامون باکتری (*Pritrichous*) تقسیم می شوند. پایه فلاژل در غشای پلاسمایی قرار گرفته و لنگرگاه و تعداد تاژک ها در باکتری ها فرق خواهد کرد. لازم به ذکر است که در بعضی گونه های باکتری وجود تاژک و مژک هر دو امکان پذیر بوده و گاهی هم باکتری فاقد هر دو ضمائم می باشد. تاژک ها می توانند فرد و یا زوج بوده و همچنین در نواحی مختلف و یا بصورت یک دسته در کنار هم در بخش انتهایی یاخته (قطبی) قرار گیرند. همچنین، کارشناسان در بعضی گونه های مختلف باکتریای موجود در شکمبه یک ورقه نازکی از جنس پلی ساکارید شناسایی نموده اند که در هنگام مصرف مواد آنتی بیوتیکی باکتری از خود ترشح تا در مقابل این مواد خارجی ایمنی یابد. این ماده می تواند در برابر سموم سایر باکتری ها مقاوم و جان باکتری را در برابر تغییرات ناگهانی فلور میکروبی حفظ نماید. در صورت ادامه دار شدن شرایط نامساعد محیطی بعضی باکتری ها هاگ داخلی تشکیل و به حالت صفر فیزیولوژیک قرار می گیرند. در این حالت مقاومت باکتری در برابر شرایط سخت محیطی بالا می رود.

۴-۱-۲-۱ ساختمان شیمیایی باکتری ها

آشنایی با ساختمان شیمیایی باکتری ها امکان شناسایی بهتر آنها را فراهم می سازد. به دلیل تنوع گسترده باکتری ها در شکمبه هنوز یک اتفاق نظر واقعی درباره وضعیت شیمیایی آنها دیده نمی شود.

اما اکثر محققین درباره ساختار شیمیایی باکتری ها مدعی هستند که از ۶ عنصر خاص (کربن ۵۵ درصد ، اکسیژن ۲۰ درصد، نیتروژن ۱۰ درصد، هیدروژن ۸ درصد، فسفر ۳ درصد و گوگرد ۱ درصد ماده خشک میکروبی) ساخته شده اند. در کنار این عناصر کارشناسان ساختار شیمیایی عمده باکتری ها را به چهار بخش عمده تقسیم می کنند. اولین ساختار شیمیایی در آنها، پروتئین و ترکیبات مشابه آن است که ۵۲/۴ درصد ماده خشک باکتری ها را شامل می گردد. سایر ترکیبات شیمیایی اعلام شده به ترتیب اهمیت، اسیدهای نوکلئیک و مشتقات بازی آنها ۱۹/۹ درصد، کربوهیدرات ساختمانی و غیر ساختمانی ذخیره ای ۱۶/۶ درصد و چربی ها با مشتقات فراوان در آن ۹/۴ درصد از ماده خشک باکتریایی را شامل می گردند.

۲-۴ کشت باکتری ها

پیشرفت و توسعه کشت های بی هوازی در آزمایشگاه این امکان را برای محققین فراهم نموده است که شناسایی دقیق تری از گونه های باکتری موجود در شکمبه داشته باشند. اگر چه روش های مختلفی از کشت های میکروبی در آزمایشگاه دیده می شود، اما همچنان کارشناسان جهت پیشبرد اهداف و شناسایی دقیق تر گونه های باکتری شکمبه اقدام به ساخت کشت های جدید و ترکیبی می نمایند. مطالعه جزئیات رشد و متابولیسم هر گونه باکتریایی جدا شده از شکمبه تحت روش های کشت بی هوازی دانش باکتری شناسی و بیوشیمی زیستی را افزایش می دهد تا بتوان مفهوم بهتری از تخمیر شکمبه ایی ارائه نمود. بطور مثال دسته ایی از باکتری ها ممکن است که با خوراک مصرفی وارد شکمبه شوند، اما در تخمیر مواد مغذی اثر خاصی نداشته و یا حتی مطلوب تخمیر نباشند. با کمک باکتری شناسی از طریق کشت بی هوازی می توان به این موارد پی برده و در رفع موارد خاص اقدام نمود. همچنین با شناسایی دقیق تر تعداد و گونه های باکتری می توان روند متابولیسمی را در خوراک های مختلف براساس جمعیت باکتریایی رو به افزایش پیگیری و ارتباط آن را با محیط پیرامون دام مشخص نمود. البته در کشت های بی هوازی آزمایشگاه به دلیل فقدان روابط کامل میکروبی موجود در شکمبه، گاهی باکتری ها رشد مطلوبی نداشته و یا مواد تخمیری حاصل از آنها منحصرا محدود به شرایط آزمایشگاهی باشد. بطور مثال؛ افزایش اتانول در بعضی از کشت ها که در پروسه های تخمیری شکمبه اصلا قابل رویت نخواهد بود. با این وجود استفاده از کشت های بی هوازی می تواند معیارهای بیشتری از شناسایی باکتری ها را در اختیار محققین قرار داده تا دستکاری های شکمبه به صورت مناسب تری اجرا گردد.

۱-۲-۴ نمونه گیری از شکمبه

تکنیک ها و روش های نمونه برداری از شکمبه به میزان کمتری مورد توجه کارشناسان قرار گرفته است. یکی از عواملی که می تواند باعث کاهش دقت در شناسایی گونه های میکروبی و بخصوص باکتریایی در شکمبه شود، نمونه برداری غیر اصولی و ناهمگن در پژوهش های انجام شده است. تفاوت در نحوه نمونه برداری می تواند فاکتورهایی که در مقیاس های آماری بی معنی و نامفهوم بوده است را معنی دار نشان داده و سبب انحراف محقق از فعالیت های اصلی خود شود. محتویات داخلی شکمبه یک محیط ناهمگن و مخلوطی از لایه های مختلف غذایی بوده که به فاکتورهایی مانند زمان های خوراک دهی، نرخ عبور و میزان مایعات فراهم شده در مخزن وابسته است. این ناهمگنی سبب تغییر واکنش های بیوشیمیایی در مکان های مختلف مخزن شکمبه می گردد. لذا مدارک فراوانی مشاهده می شود که نمونه برداری ناصحیح از مکان های مختلف شکمبه سبب تغییر روند آزمایش و شناسایی نامناسب و گاه اغراق آمیز از گونه های میکروبی و فرآیندهای شیمیایی شده است. بطور مثال، واکنش شیمیایی همواره تابع میزان آب فراهم شده و نرخ عبور مواد مغذی از شکمبه بوده است، لذا با ایجاد تغییر در زمان های نمونه برداری اطلاعات متفاوتی از مخزن تخمیر برداشت خواهد شد. باید در نظر داشت که بیش از ۵۰ درصد کل کشت زنده در بخش مایع و نزدیک به ۴۱ درصد در بخش ذرات قرار داد. همچنین تعداد گونه های میکروبی بخصوص باکتری ها تابع تعداد وعده های خوراکدهی و زمان خوراکدهی می باشد. حال اگر زمان نمونه برداری در طول آزمایش متغیر گردد، اطلاعات حاصل از نمونه برداری متغیر و نامطمئن خواهد بود. تحقیقات نشان می دهد که در شناسایی گونه های باکتری و یا شمارش آنها در هر میلی لیتر مایع شکمبه، نمونه های جمع آوری شده از طریق فیستولا و یا کشتار دام در مقابل لوله های مرئیک قابلیت اطمینان بیشتری دارد. با بکارگیری فیستولا در شکمبه می توان مخلوطی از محتویات شکمبه و یا بخشی از مواد غذایی تخمیر شده مورد نظر را برداشت و رهگیری صحیح تری از گونه های باکتریایی یا میکروبی ارائه نمود. استفاده از لوله های مرئیک همواره موضوع محل نمونه گیری را مجهول گذاشته و آزمایشات را با شک و شبه روبرو می کند. مشکلات عمده دیگری که در هنگام استفاده از لوله مرئیک در نمونه برداری مشاهده می شود عبارتنداز (۱) افزایش طول لوله مرئیک سبب چین خوردگی شکمبه و کاهش دسترسی محل نمونه برداری می شود، (۲) در صورت مصرف خوراک علوفه ایی و خشن احتمال بسته شدن لوله بیش از ۸۰ درصد می باشد و (۳) آغشته شدن ترشحات دهان و مرئی مرئی با مواد نمونه برداری شده که سبب کاهش رقت میکروبی و کاهش اسیدیته می شود. کاهش اسیدیته به دلیل اثر مایعات و مواد تامپونی موجود در دهان و مری بوده و می تواند فعالیت باکتری ها را تحت تاثیر قرار دهد.

بدیهی است که با تفاوت در تکنیک های نمونه برداری، زمان نمونه برداری و نوع خوراک مصرفی گونه های باکتریایی قابل شناسایی در هر تحقیق مختلف خواهد بود. این در حالی است که در کشت های آزمایشگاهی به دلیل کنترل دقیق موارد اشاره شده دقت اطلاعات بدست آمده بیشتر خواهد بود. از طرف دیگر، سرعت نمونه گیری مایعات از شکمبه و انتقال آن از مزرعه به آزمایشگاه هم می تواند در شناسایی باکتری ها اثر بسزایی داشته باشد.

برای نمونه برداری از شکمبه جهت شناسایی باکتری ها کارشناسان ۷ اصل ذیل را مطرح نموده اند: (۱)- جیره مصرفی باید تحت کنترل و از مصرف بی رویه علوفه و یا مواد متراکم جلوگیری کرد. در طول آزمایش علاوه بر ثبات کامل میزان و اقلام جیره مصرفی، ترکیب جیره می بایست به صورت کامل بیان و تشریح گردد. (۲)- حالات شکمبه به صورت استاندارد بررسی و باید از نوسانات شدید در اسیدیته، فشار اسمزی، نرخ عبور، نرخ رقت، فشار گازها و سایر پارامترهای موثر بر تخمیر جلوگیری کرد. همچنین مقدار عددی هر پارامتر موثر بر تخمیر ثبت شود. (۳)- محل و زمان نمونه گیری کاملا مشخص و در حین نمونه گیری از روش های استاندارد استفاده گردد. (۴)- تعداد نمونه های گرفته شده و میزان هر نمونه گرفته شده باید مناسب آزمایش و براساس موضوع از پیش تعیین شده باشد. هر چه قدر تعداد نمونه های گرفته شده بیشتر و اندازه نمونه ها کوچک تر باشد، نماینده بهتری از محتویات مخزن تخمیر خواهد بود. (۵)- سرعت انتقال نمونه ها از مزرعه به آزمایشگاه باید تسریع و از استرس های طبیعی و مصنوعی مانند یخ زدگی و یا افزایش درجه حرارت نمونه برای کشت مجدد جلوگیری نمود. (۶)- وسایل اندازه گیری مقیاس بندی گردد، تا علاوه بر کاهش انحرافات بدست آمده قابلیت قیاس با سایر روش ها را داشته باشد. (۷)- تمامی مراحل کشت میکروبی بخصوص باکتری ها تشریح و حتی المقدور از محلول های تازه و مشخص استفاده گردد.

۴-۲-۲ روش های کشت باکتری

از آنجا که شکمبه دارای یکسری حالات ویژه در تخمیر می باشد، محیط کشت باکتری ها و سایر میکروارگانیسم ها باید منطبق با این شرایط تهیه گردد. این شرایط به صورت کامل در فصول قبلی اشاره شده است. اما مهمترین شرایط مورد نیاز در یک کشت موازی با شکمبه، اسیدیته ۵/۵ تا ۷/۵ و شرایط بی هوازی همراه با دمای ۳۸ تا ۴۰ درجه سانتیگراد می باشد. هانگیت (Hungate) اولین بار در سال ۱۹۴۷ اقدام به تولید کشت های بی هوازی (فقدان اکسیژن و حضور دی اکسیدکربن یا هیدروژن) در دستگاه دسیکاتور نمود. روش هانگیت با توجه به ساده بودن در مقایسه با سایر روش ها همچنان کارآ است. تلفیق روش هانگیت و هسپل (Hespell) که در پتری دیش آزمایشات خود را انجام داده است،

باعث می گردد، تکرارهای فراوانی در یک آزمایش با موضوعات مختلفی شکل بگیرد. مشکل اصلی کشت های تولید شده فقدان شبیه سازی کامل شکمبه در نقل و انتقال مواد مغذی و تخمیر توسط باکتری ها و روابط کامل میکروبی در آنها می باشد. کشت های باکتری می تواند به صورت محیط بسته (استاتیک) و باز یا کشت ممتد (دینامیک) طراحی شوند. واضح است که محیط بسته نقایصی چون تجمع مواد تولید شده و یا تمام شده مواد مغذی را در پی خواهد داشت. از این رو کارشناسان در کشت های ویژه که در مخازن بیورآکتور نگهداری می شود، تا حدی نقیصه ورود مواد مغذی به مخزن و خروج مواد تخمیری را برطرف نموده اند. اما این روش از شناسایی باکتری ها با وجود دقت فراوان بسیار پر هزینه و زمان بر خواهد بود. همچنین جدا شدن باکتری ها از محیط طبیعی و رشد در محیط نیمه خالص تغییرات عمده ای را در جمعیت و فعالیت های آنها خواهد گذاشت و تعمیم آن را به محیط واقعی سخت تر خواهد نمود. اما در نهایت روش کشت باکتری ها متنوع و بر سه روش کلی کشت خالص، کشت مخلوط و کشت های میانی (*vivar*) صورت می گیرد.

محیط کشت براساس کاربرد آنها به محیط های انتخابی، افتراقی، غنی کننده و کامل طبقه بندی می شوند. محیط های انتخابی دارای یک عامل انتخابی بوده که ویژه جداسازی یا کشت گروه خاصی از باکتری هاست . عامل انتخابی معمولا با جلوگیری از رشد سایر ارگانیسم ها عمل می نماید. اما محیط های کشت افتراقی اجزایی دارند که سبب می شوند برخی از باکتری ها در مقایسه با سایر باکتری های دیگر که در همان محیط کشت رشد می کنند به شکل متفاوتی ظاهر شوند. محیط کشت غنی کننده هم معمولا در مواردی بکار می رود که تعداد باکتری مورد جستجو در نمونه آزمایشی کم بوده و یا بعلت وجود زیاد سایر باکتری ها جدا کردن آن با اشکال مواجه است. این محیط امکان رشد برای باکتری ها را از نظر pH و مواد غذایی فراهم می سازد. در نهایت، محیط کشت کامل کلیه مواد لازم برای رشد باکتری ها را فراهم نموده و فاقد مواد ضد میکروبی است. این کشت حدودا ۸۰ درصد از باکتری ها را تحت پوشش قرار داده و شامل گلوکز (۰/۰۵٪)، سلوبیوز (۰/۰۵٪)، نشاسته محلول (۰/۰۵٪)، مواد معدنی (۳/۷۵٪)، سولفیدسدیم ۱/۲۵ درصد (۰/۰۲۵٪) بعنوان احیا کننده، سیستئین-اسیدکلریدریک ۲/۵ درصد (۰/۰۲۵٪)، رزازورین ۰/۱ درصد (۰/۰۰۰۱٪) بعنوان معرف اسیدیته، کربنات سدیم ۸ درصد (۰/۰۴٪)، تری پتیکاز (۰/۲٪)، عصاره مخمر (۰/۰۵٪)، اسیدهای چرب فرار (۰/۳۱٪)، Hemin (۰/۰۰۰۱٪)، آگار (۲٪) و گازکربنیک می باشد. این محیط فاقد هر گونه مهارکننده و اندیکاتور است، لذا با رشد باکتری ها مختلف بر روی آن هیچگونه تغییر رنگی مشاهده نمی شود.

۴-۲-۲-۱ آماده سازی محیط کشت

برای کشت باکتری و سایر میکروارگانیسم ها لازم است یک محیط کشت مناسب و استاندارد تهیه گردد. محیط کشت ها می توانند مایع (Broth) و یا جامد (دارای ژل آگار) باشند. همچنین، کشت های جامد می توانند به صورت شیبدار در لوله و یا مسطح در پتری دیش تولید شوند. در زمینه ساخت محیط کشت، با استفاده از روش بریانت (Bryant) محلول بی هوازی را که برای تهیه رقت های کاهشی سریالی استفاده می شود، ساخته می شود. برای آماده سازی محلول فوق ابتدا ۴۵ میلی لیتر محلول معدنی اول (۳ گرم در لیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات)، ۴۵ میلی لیتر محلول معدنی دوم (۳ گرم در لیتر پتاسیم هیدروژن فسفات، ۶ گرم در لیتر سولفات آمونیوم، ۰/۸ گرم در لیتر کلسیم کلراید، ۰/۶ گرم در لیتر منیزیوم فسفات و ۶ گرم در لیتر سدیم کلراید)، ۰/۳ میلی لیتر رسازورین ۰/۱ درصد (Resazurin) را با ۱۹۷ میلی لیتر آب مقطر (جهت به حجم رساندن) مخلوط و می جوشانیم. بعد از آنکه رنگ رسازورین به رنگ صورتی مبدل شد، جوشاندن محلول را متوقف و در حضور دی اکسیدکربن سرد می کنیم. آنگاه ۷ میلی لیتر بی کربنات سدیم (۱۲ درصد) را با ۵ میلی لیتر سیستئین- اسیدکلریدریک (۳ درصد) را به محلول اضافه و به ورود دی اکسیدکربن ادامه داده تا رسازورین به طور کامل حذف گردد. آنگاه در شرایط بی هوازی و یا در حضور CO_2 محلول تهیه شده را در لوله های ۱۶×۱۵۰ میلی متری وارد و ۱۳ لوله آماده و نگهداری می کنیم. برای رقیق سازی مایع شکمبه، ۲۰ گرم از محتویات شکمبه را با ۱۸۰ میلی لیتر محلول بی هوازی رقیق ساز تولید شده در حضور دی اکسیدکربن مخلوط و به این ترتیب مایع شکمبه ای با ۱۰ برابر رقت خواهیم داشت. برای رقت بیشتر، ۱ میلی لیتر مایع شکمبه تولید شده را به یک لوله حاوی ۹ میلی لیتر محلول رقیق ساز وارد و به ازای رقت مورد نیاز، یک میلی لیتر مایع داخل لوله را به لوله بعدی منتقل می کنیم. با این شیوه رقت های سریالی تا غلظت 10^{-12} از اولین رقت تولید شده ساخته می شود. بعد از تهیه محلول بی هوازی رقیق سازی سریالی، محلولی را که بیشترین احتمال حضور باکتری زنده (MPN) در آن است را تهیه می نماییم. محلول های تهیه شده به سه بخش سلولایتیک، آمیلولایتیک و پروتئولایتیک تقسیم می شوند (جدول ۱-۴).

همه اجزای گروه ۱ را در فلاسکی ریخته و در محیط بی هوازی حاوی دی اکسیدکربن و دمای ۴۵ درجه سانتیگراد حرارت می دهیم. سپس اقلام گروه ۲ را به محلول گروه یک سرد شده اضافه و اسیدیته را به ۶/۸ می رسانیم. برای تنظیم اسیدیته محلول فوق می توان از هیدروکسید سدیم و اسیدفسفریک استفاده نمود. پس از تهیه کشت نهایی و انتقال ۹ میلی لیتر آن به لوله های آزمایش، مرحله بعدی یعنی تزریق ۱ میلی لیتر محلول رقیق سازی شده از مایع شکمبه به کشت مزبور آغاز می گردد. آنگاه لوله های کشت شده در دمای ۳۶ تا ۳۸ درجه سانتیگراد انکوباسیون می شوند. مدت زمان نگهداری در انکوباسیون براساس نوع باکتری در حال رشد متفاوت بوده و برای باکتری های

آمیلولایتیک ۱۰-۷ روز، سلولایتیک ۲۱-۷ روز و پروتئولایتیک ۱۵-۱۰ روز پیشنهاد می شود. بعد از گذشت مدت زمان معینی از انکوباسیون و تایید رشد باکتری ها براساس میزان تغییرات اسیدیته (لوله هایی که اسیدیته آنها بیشتر از ۰/۲ واحد کاهش یافته است به عنوان مثبت در نظر گرفته می شوند)، کاهش محسوس مواد مغذی اولیه در محیط کشت و سایر پارامترهای استاندارد مانند کدر شدن رنگ محیط کشت مایع، شمارش احتمالی حضور باکتری ها آغاز می گردد.

جدول ۱-۴ یک نمونه از محیط کشت مورد نیاز جهت رشد باکتریایی.

گروه	اقلام موجود در محلول	سلولایتیک[1]	آمیلولایتیک[2]	پروتئولایتیک[4]
۱	آگار باکتو- کاسیتون	۰/۲۵ گرم	۱ گرم	-
	عصاره باکتو- مخمر	۰/۰۶ گرم	۰/۲۵ گرم	-
	محلول معدنی اول	۱۵ میلی لیتر	۱۵ میلی لیتر	۱۵ میلی لیتر
	محلول معدنی دوم	۱۵ میلی لیتر	۱۵ میلی لیتر	۱۵ میلی لیتر
	مایع شکمبه سانتریفوژ شده	۲۰ میلی لیتر	۲ میلی لیتر	۲۰ میلی لیتر
	رسازورین (۰/۱ درصد)	۰/۱ میلی لیتر	۰/۱ میلی لیتر	۰/۱ میلی لیتر
	نشاسته	-	۰/۵ گرم	-
	تریپتوز	-	-	۰/۳ گرم
	گلوکز	-	۰/۲ گرم	۰/۱ گرم
	مالتوز	-	-	۰/۱ گرم
	سلوبیوز	۰/۰۲۵ گرم	-	۰/۱ گرم
	کازئین[3]	-	-	۰/۵ گرم
۲	سدیم بی کربنات	۰/۴ گرم	۰/۴ گرم	۰/۴ گرم
	سیستئین—اسیدکلریدریک	۰/۰۵ گرم	۰/۰۵ گرم	۰/۰۵ گرم
	آب مقطر (جهت ازدیاد حجم)	۱۰۰ میلی لیتر	۱۰۰ میلی لیتر	۱۰۰ میلی لیتر

[1] در این کشت یک نوار کاغذی فیلتر واتمن (شماره یک) قرار داده می شود. در صورت حفره دار شدن فعالیت باکتری تایید می گردد.

[2] برای تعیین باکتری هیدرولیز کننده نشاسته، به لوله های کشت داده شده ۰/۱ میلی لیتر محلول {ید(یک قسمت) و یدید پتاسیم (دو قسمت)} اضافه می شود. لوله ای قهوه ای رنگ مثبت و لوله مشکی رنگ منفی بودن آزمایش را نشان می دهد.

[3] یک میلی لیتر کازئین (۵ درصد در سود ۰/۱ نرمال با اسیدیته ۷) در ۸ میلی لیتر محیط اتوکلاو شده قبل از کشت میکروب استفاده شود.

[4] یک میلی لیتر از محیط کشت مزبور را با یک میلی لیتر اسید کلریدریک یک نرمال مخلوط و کیفیت جذب نور را به عنوان علامت تجزیه پروتئین ثبت می کنیم.

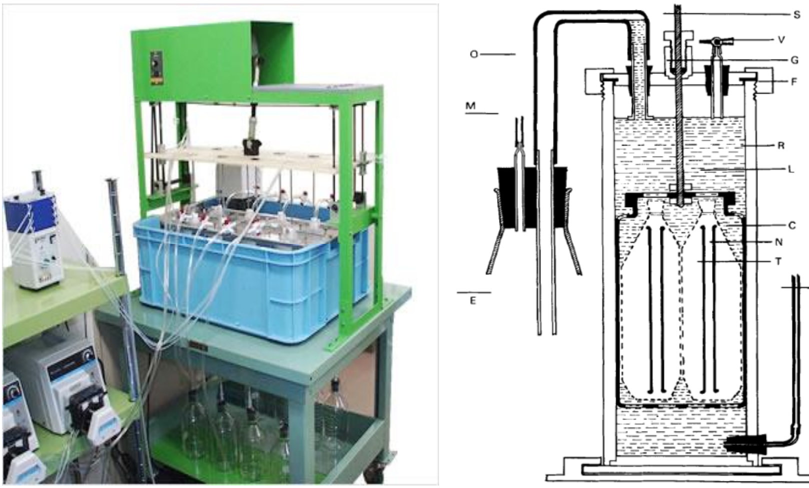
۲-۲-۲-۴ کشت خالص

در روش کشت خالص ابتدا جداسازی گونه های باکتریایی انجام می گیرد. سپس در محیط کشت براساس امکانات موجود و پارامترهای مورد نظر، باکتری جدا شده کشت و خصوصیات ریخت شناسی، تولیدمثل و رشد آنها مشخص می گردد. این روش نسبت به سایر روش ها مدت زمان بیشتری را صرف می نماید و پیچیده گی های خاص خود را مانند جداسازی باکتری در پی دارد. همچنین، این کشت برعکس سایر کشت ها دارای نواقصی چون فقدان روابط میکروبی (تضاد و مشارکت) در کشف خصوصیات باکتریایی می باشد. لذا تشریح فعالیت های میکروبی در آن سخت و تقریبا با شک و شبه همراه خواهد بود. اما کشت خالص این امکان را بوجود آورده است که بتوان نیاز واقعی باکتری ها را برای ادامه رشد و تخمیر مواد مغذی بطور دقیق محاسبه نمود. بدین معنی که در کشت خالص روابط بین میکروب ها متوقف و باکتری برای ادامه حیات نیاز به دریافت دسته ایی از مواد آلی، معدنی و ویتامینه می گردد که از دید محققین پوشیده مانده است. لذا با این روش می توان به کشف فاکتورهای مورد نیاز باکتری مانند مواد مغذی مورد نیاز آنها، میزان و نوع تولیدات واقعی و نحوه گسترش در تجزیه پذیری مواد مغذی خاص پرداخت.

۴-۲-۲-۳ کشت مخلوط

این نوع کشت بوسیله انکوباسیون کل محتویات شکمبه صاف شده همراه با یک ماده مغذی انجام می شود. این کشت همانند کشت های دیگر به دو شکل بسته (محیط استاتیک) و باز (محیط دینامیک) انجام می گیرد. پژوهش های زیادی در زمینه کشت مخلوط تحت عنوان تخمیرهای *in vitro* صورت گرفته است. از آنجا که فاکتورهای ناشناخته ای در تخمیر شکمبه وجود دارد، کارشناسان بر این باور شدند که استفاده از کشت مخلوط با کمک مایع شکمبه و آب مقطر می تواند نقیصه فاکتور ناشناخته را برطرف نمایند. همچنین، کشت مخلوط اجازه شناسایی دقیق تر تغییر یک ماده مغذی را به یک ماده تخمیری بوسیله نشانگر ها نشان می دهد. بطور مثال؛ توسط کشت مخلوط مشخص شده که اسیدهای آمینه والین و پرولین به اسیدهای چرب شاخه دار ایزوبوتیریک و والریک تغییر می یابند. کشت مخلوط این مطلب را به ذهن القا می نماید که محقق می تواند یک فعالیت هضمی را اندازه گیری که گویی در شکمبه رخ داده است. اما کارشناسان نقایصی را بر کشت مخلوط وارد دانسته اند. مثلا فقدان شناسایی کامل یک باکتری در مسیر متابولیسمی بدلیل تجمع گونه های مختلف میکروبی در هضم یک ماده غذایی از جمله موارد است. همچنین در هنگام ساخت کشت مخلوط چقدر بر صحت و سلامتی میکروب ها انتقال یافته مانند پروتوزوآها و قارچ های می توان اعتماد کرد. و یا تاثیر ماده غذایی وارد شده در کشت مخلوط چقدر بوده و تمامی این اثرات قابل کنترل هست؟

یکی از مهمترین تشکیلات کشت مخلوط در *in vitro* تکنیک شبیه سازی شکمبه به نام RUSITEC است. این دستگاه جهت مهیا کردن سه بخش از چهار بخش موجود در شرایط مزرعه ای (*in vivo*) شکمبه طراحی و کاربرد مناسبی در شبیه سازی و شناسایی فعالیت باکتریایی دارد (شکل ۳-۴). قسمت چهارم روند تخمیر واقعی یعنی چسبیدن باکتری ها به دیواره شکمبه و تشکیل در این دستگاه وجود ندارد. در این دستگاه همه موارد شبیه با شکمبه طراحی و فقط روند جذب دیواره وجود نداشته و مواد تخمیری با ورود مایعات جدید (بزاق) از دستگاه خارج می شوند. دامنه حرکت مواد در مخزن تخمیر ۸ دقیقه یکبار می باشد. بزاق هم به صورت یک فشار جزئی مثبت به کف داخل مخزن رانده و به تدریج جهت تخلیه مواد حاصل از تخمیر میکروبی به خارج برده می شود. هر ۲۴ ساعت کیسه تلقیحی در مخزن برداشته و تعویض می گردد.

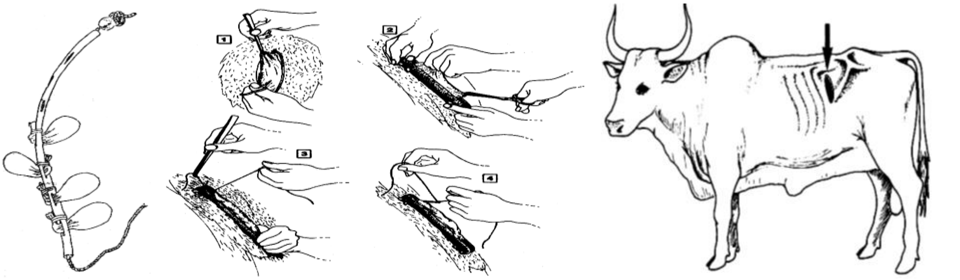


شکل ۳-٤ دستگاه شبیه ساز تخمیر شکمبه. شکل سمت چپ نمای کلی دستگاه و شکل سمت راست یکی از تانک های تخمیر است. (□) ساخته شده از نوعی پلاستیک شیشه ای، (■) ساخته شده از کائوچو یا پلی اتیلن، (S) میله متحرک در مخزن از جنس استیل، (V) دریچه نمونه گیری، (G) نگهدارنده، (F) لبه بیرونی پیچ، (R) لوله اصلی واکنش دهنده، (L) مایع شکمبه، (C) ظرف محتوی خوراک سوراخ دار، (N) کیسه های توری نایلون بگ، (T) لوله محکم، (I) راه ورود بزاق، (O) خروجی مواد سر ریز شده، (M) خط جمع آوری گاز و (E) مجرای جمع آوری مواد سر ریز شده در مخزن نهایی است.

۴-۲-۲-۴ کشت های میانی (*in vivo-in vitro*)

این نوع کشت برای اولین بار در دهه ۵۰ به صورت قرار دادن یک ظرف در داخل شکمبه انجام گرفت. این ظرف نیمه تراوا برای میکروب ها نفوذ ناپذیر بوده و نمونه ها می توانند بوسیله یک لوله به داخل و یا خارج مخزن وارد شوند. لذا کشت میکروبی می تواند در مایع شکمبه بدون حضور سایر میکروب های غوطه ور در مایع شکمبه صورت بگیرد. اما مشکل اصلی این کشت برقراری تعادل در

حاشیه بخش نفوذپذیر ظروف است. این تکنیک اصطلاحا ویوار نامیده می شود. تکنیک کیسه گذاری با غشای تراوای ورود و خروج میکروبی به تقلید از این روش بنیان گذاری شده است. روش مزبور را in sacco می نامند (شکل ۴-۴). کیسه ها از جنس نایلون (داکرون) با سوراخ مشخص می باشند و به صورت معلق در شکمبه آویخته می شوند. این روش همانند سایر روش ها دارای معایب و مزایای خاص خود می باشد که کارشناسان براساس آزمایشات مکرر معایب اصلی آن را چنین عنوان نمودند. (۱) هضم و تجزیه پذیری ماده خشک و اسیدیته داخل و خارج کیسه بطور معنی داری با هم متفاوت بودند. (۲) به علت عدم خروج مناسب گاز از کیسه، کیسه های حاوی نمونه متورم و تبادل مایعات در آن با مشکل مواجه می شود. (۳) تعداد میکروارگانیسم های موجود در کیسه های نایلونی در مقابل محیط شکمبه بیشتر بود که می تواند ناشی از کاهش میزان شسته شدن میکروب ها در آن باشد. تجزیه پذیری در این کیسه متاثر از نوع خوراک مصرفی دام می باشد که در ثبت اطلاعات لازم است به عنوان تصحیح فاکتور موثر وارد گردد. اما از مزایای این روش سرعت نسبی هضم و قابلیت تجزیه پذیری یک جیره را می توان در شکمبه به صورت صحیح تری از سایر کشت ها مشخص نمود. محققین نقایصی را در روش های ویوار و کیسه گذاری عنوان نموده اند که کاملا منطقی می باشند. لذا در هنگام پذیرفتن اطلاعات از طریق آنها بایستی شرط احتیاط را بکاربرد.



شکل ٤-٤ مراحل کیسه گذاری در شکمبه. شکل سمت راست محل برش جهت کیسه گذاری را نشان می دهد. شکل میانی آماده سازی محل برش را که به ترتیب شامل (۱) ایجاد یک چین خوردگی روی شکمبه جهت ایجاد برش، (۲) قرار دادن چوب ها کنار لبه چین خوردگی، (۳) اتصال دوچوب به هم و قرار داشتن پوست چین خورده در میان آنها و (٤) محکم کردن دو چوب جهت خشک کردن پوست در آن ناحیه می باشد، به تصویر می کشد و شکل سمت چپ نحوه چیدمان کیسه های تجزیه پذیری را روی لوله جهت بارگذاری در شکمبه بیان می کند.

نحوه برداشت کیسه های تجزیه پذیری در روش کیسه گذاری براساس زمان تعیین شده انجام گرفته و کیسه های بالایی در زمان سریعتر و کیسه های پایینی در زمان طولانی تر برداشت می شوند. در هنگام برداشتن کیسه ها باید دقت فراوانی نمود تا کیسه های که لازم است بیشتر باقی بمانند از مایع شکمبه خارج نشده تا اکسیژن کمتر صدمه را به میکروارگانیسم های آنها وارد نماید.

۳-۲-۴ نگهداری محیط کشت

نوع نگهداری محیط کشت تهیه شده می تواند بر مدت زمان نگهداری، انتقال و رشد مطلوب میکروارگانیسم ها اثر بسزایی داشته باشد. بطور مثال؛ کشت های جامد و یا نیمه جامد در لوله های آزمایشگاهی و پتری دیش در مقابل کشت های مایع می تواند یک تا سه هفته محیط مطلوبی را برای میکروب ها فراهم نموده و انتقال به شکل مناسبی انجام گیرد. البته باید در نظر داشت که نوع کشت همواره با نوع میکروارگانیسم منطبق بوده و جهت نگهداری مناسب میکروب ها نمی توان از کشت های عمومی استفاده کرد. محیط کشت را می توان براساس کاربرد میکروب ها در آزمایشگاه مانند شمارش، رشد و تولیدمثل در اتاق حرارتی و یا سردخانه به صورت مرده یا زنده نگهداری نمود. بطور مثال؛ محققین توانسته اند کشت های فریز شده (یخ زده) لاکتوباسیلوس و بوتیری ویبریو را در آزمایشگاه تحت حالت استاندارد و در دمای ۱۰- درجه سانتیگراد بمدت یک تا دو سال نگهداری و پس از این مدت آنها را به رشد مجدد وادار نمایند.

۴-۲-۴ شمارش باکتری ها

پژوهش ها نشان داده است که نوع شمارش میکروبی همانند نحوه نمونه برداری و کشت میکروبی تاثیر بسزایی در شناسایی جمعیت باکتری های یک مخزن تخمیری دارد. دو روش کلی در شمارش باکتری ها عنوان شده است که شامل شمارش مستقیم و شمارش بر روی محیط کشت یا زنده می باشد.

۱-۴-۲-۴ شمارش مستقیم

در این روش از شمارش نمونه های تهیه شده به دو صورت مایع و جامد تهیه می شوند. در این زمینه تحقیقات گسترده ای صورت گرفته است. در روش مایع، ابتدا نمونه رقیق سازی، رنگ آمیزی گرم و سپس بر روی اسلاید با حجم مشخص شمارش می شود. در حالت مایع، براساس روش وارنر، سه نوع روش شمارش باکتریایی دیده می شود. روش اول تعداد استاندارد؛ حدود ۱۰۰ میلی لیتر محتویات مخزن تخمیر را جدا سازی و بوسیله یک توری صاف می نماییم. مایع بدست آمده از این روش را با محلول نمکی فرمالین به نسبت ۱ به ۵ رقیق و شمارش استاندارد آغاز می شود. روش دوم تعداد حقیقی کل؛ ۵۰ گرم نمونه از محتویات مخزن تخمیر را با ۲۰۰ میلی لیتر محلول نمکی فرمالین مخلوط و صاف می کنیم (بخش مایع آن نمونه استاندارد نام دارد). بخش جامد بدست آمده را با ۱۰۰ میلی لیتر محلول نمکی فرمالین مخلوط و دوباره صاف می نماییم (بخش مایع آن نمونه شسته شده نام دارد). سپس، نمونه جامد را دوباره در ۵۰ میلی لیتر محلول نمکی فرمالین مخلوط و بمدت ۴ دقیقه مخلوط (هموژناسیون) و صاف می کنیم. این مراحل هفت بار تکرار و بخش جامد انتهایی را با ۵۰ میلی لیتر محلول نمکی فرمالین

به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ و دو بخش جامد و مایع جدا شده را با هم صاف می نماییم (همه مایعات گرفته شده در این مرحله نمونه مخلوط نام دارد). مجموع اعداد در نمونه های استاندارد، شسته شده و نمونه مخلوط (جمعیت باکتریایی ۲ تا ۳ برابر نمونه استاندارد است) تعداد حقیقی کل باکتری ها را نشان می دهد. روش سوم نمونه مایع حقیقی شکمبه؛ ۲۰۰ گرم محتویات شکمبه را صاف و بخش مایع آن را توسط محلول نمکی فرمالین رقیق و شمارش می کنیم. آزمایشات نشان می دهد که بیشترین جمعیت باکتری ها از نمونه های مخلوط بدست آمده می باشد، که گویای نزدیک بودن باکتری ها به ذرات غذایی است.

در روش جامد یک مقدار مشخصی از رقت محتویات مخزن تخمیر تهیه و بر روی یک اسلاید تثبیت می شود. جهت تثبیت ابتدا اسلاید حاوی رقت خشک و سپس رنگ آمیزی گرم می گردد. جهت نگهداری طولانی مدت، از لامل هایی که بر روی اسلاید تثبیت شده مستقر می شوند، استفاده می نماییم. در این روش همانند روش مایع دو نوار در گوشه اسلاید شمرده می شود. سپس با در نظر گرفتن قطر میدان دید، محیط اسلاید و حجم نمونه رقیق شده بر روی اسلاید، تعدا باکتری ها مشخص می گردد.

۲-۴-۲-۴ شمارش کشت زنده

عمده ترین مشکل در روش شمارش زنده، کیفیت محیط کشت می باشد. برای رفع این مشکل می توان از محیط کشتی بهره برد که برای رشد میکروب ها محدود کننده نباشد. لذا، استفاده از چند نوع منبع انرژی زا و نیتروژنی همراه با دی اکسیدکربن برای ایجاد شرایط بی هوازی لازم الاجرا است. در این روش مایع گرفته شده از شکمبه در محیط کشت سلولز و آگار تلقیح و شمارش صورت می گیرد. تحقیقات نشان می دهد که تعداد باکتری های قابل کشت بر روی محیط کشت غذایی (براساس کیفیت محیط کشت و خوراک مصرفی دام) بین ۰/۵ تا ۱۲ درصد از کل باکتری های شمرده شده مستقیم می باشد. این تفاوت می تواند ناشی از مرگ و میر باکتری ها بوجود آید که در شمارش مستقیم همه آنها محاسبه می شوند. همچنین، اختلاف باکتری های شمرده شده در محیط کشت می تواند تا حدودی ناشی از دام هایی باشد که از علوفه و یا مواد متراکم مصرف نموده اند. دام های که از علوفه مصرف می کنند دارای باکتری های مرده بیشتری در مقایسه با دام هایی که از کنسانتره استفاده نموده اند، خواهند بود. این امر می تواند ناشی از کمتر بودن انرژی قابل دسترس و یا چسبیده بودن باکتری ها به علوفه مصرفی (به دلیل چسبیده بودن باکتری به مواد فیبری کمتر از مخلوط جدا می شود) بروز یابد.

۳-۴ طبقه بندی باکتری های شکمبه

طبقه بندی های متفاوتی در این زمینه مشاهده می شود، که مهمترین آنها برپایه مواد اولیه مورد مصرف جهت تخمیر و سپس براساس شرایط زیستی صورت گرفته است. امروزه کارشناسان جهت مطالعه دقیق تر باکتری ها و شناسایی کامل آنها دو طبقه بندی مذکور را ادغام و یک طبقه بندی ویژه ارائه نموده اند. این طبقه بندی دارای ۱۰ گروه فعالیتی براساس خوراک و ۲ گروه زیستی براساس شرایط رشدی باکتری ها می باشد. با وجود این نوع طبقه بندی، کارشناسان بیشتر براساس نوع خوراک مصرفی به شناسایی باکتری ها می پردازند. اما پیش از آنکه در مورد گونه های مختلفی میکروارگانیسمی و نحوه طبقه بندی آن بحث نماییم، لازم است بدانیم که آیا باکتری خالص سازی شده از شکمبه به صورت موقت و عبوری به همراه اقلام مصرفی وارد مخزن شده است و یا اینکه یک باکتری واقعا موثر در تخمیر شکمبه می باشد. به همین دلیل کارشناسان در کشت های باکتریایی، معیاری مشابه متابولیت های حاصل از تخمیر شکمبه را برای شناسایی توانایی باکتری در حیات شکمبه ایی ارائه نمودند. خصوصیات مهمی چون اسیدیته، دما، پتانسیل اکسید و احیا و نیازهای تغذیه ایی باکتری محیط کشت ناشی از فعالیت باکتری باید با محیط شکمبه یکسان و یا سازگار باشد. وجود این خصوصیات ناشی از فعالیت باکتریایی و حضور باکتری در رقت 1×10^{-8} از محتویات شکمبه می تواند احتمال حضور باکتری را در فعالیت های شکمبه پر رنگ جلوه دهد. از طرف دیگر جداسازی مکرر باکتری از شکمبه هم می تواند دلیل مناسبی برای حضور مسلم باکتری در شکمبه دانست.

۱-۳-۴ طبقه بندی باکتری ها براساس گروه زیستی

یکی از روش های طبقه بندی باکتری ها در شکمبه بررسی شرایط رشدی آنها می باشد. این نوع طبقه بندی بیشتر براساس مصرف و یا عدم مصرف اکسیژن پایه ریزی شده است. کارشناسان به دلیل تفاوت های فراوان بین گونه های باکتریایی و مشکل بودن جداسازی کامل آنها، طبقه بندی خود را کلی تر و براساس جنس باکتری ها انجام دادند. این روش طبقه بندی به کارشناسان اجازه می دهد میکروارگانیسم هایی که قدرت تغییر زیستی مناسبی را دارند، شناسایی و در دستکاری شکمبه گونه های مختلف آن را مورد نقد و بررسی قرار دهند. بطور مثال؛ دسته ایی از باکتری ها که در حضور اکسیژن فعالیت خود را جهت مصرف آن تغییر می دهند، می توانند در صورت ورود اکسیژن به شکمبه آن را مصرف تا شرایط کاملا بی هوازی برای سایر باکتری ها ایجاد نمایند. همچنین، شناسایی دقیق تر باکتری ها امکان پرورش مناسب آنها را در کشت های مصنوعی فراهم نموده و کنترل کشت های مخلوط را برای محققین آسانتر می نماید.

۱-۱-۳-۴ باکتری های بی هوازی اختیاری

اولین گونه های باکتریایی که شکمبه را تسخیر می کنند، گروه های هوازی و یا بی هوازی اختیاری می باشند. گونه های مختلفی از باکتری های بی هوازی اختیاری که در محیط شکمبه می زیسته اند، جداسازی شده است. اما این گونه ها از لحاظ کمی اهمیت چندانی نداشته و بیشتر در گوساله های جوان دیده می شوند. این باکتری ها می توانند در حضور اکسیژن به فعالیت خود پرداخته و در غیاب اکسیژن به تخمیر بی هوازی بپردازند. درصد حضور این نوع باکتری ها در خوراک مصرفی زیاد و کارشناسان بیشترین عامل حضور این باکتری ها در شکمبه را خوراک مصرفی می دانند. اما امکان توسعه کامل آنها در شکمبه وجود ندارد. جهت بررسی دقیق تر این دسته از باکتری ها کارشناسان آن را به پنج گروه عمده کلی فرم ها (*Coliform*)، باسیلوس ها (*bacilli*)، پروپیونی باکتریوم ها (*Propionibacteria*)، استرپتوکوکوس ها (*Streptococcus*) و لاکتوباسیلوس ها (*Lactobacilli*) تقسیم می نمایند.

- **کلی فرم ها؛**

به طور طبیعی این گروه از باکتری ها در شکمبه کمتر دیده شده و مورد مطالعه قرار می گیرند. در شرایط عادی تعداد این باکتری ها به لحاظ کمی $۱۰^{۳}$-$۱۰^{۶}$ در هر میلی لیتر مایع شکمبه می باشند. باکتری های کلی فرمی در دستگاه گوارش دام های جوان (۱ تا ۳ هفته) و تازه از شیر گرفته شده بیشتر از دام های بالغ تر می باشد. کلی فرم ها در تخمیر زایلان ها موثر بوده و با ازدیاد این ماده غذایی تعداد آنها افزایش می یابند. هر چند محققین تاثیر معنی داری در افزایش کلی فرم ها مشاهده ننموده اند. یکی از مهمترین گونه های باکتریای موجود در گروه کلی فرم ها، اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) می باشد. سایر گونه های مهم کلی فرم ها به ترتیب شامل ایروباکتر ایروجنز (*Aerobacter aerogenes*) و ایروباکتر کلوآکه (*Aerobacter cloacae*) می باشد.

- **باسیلوس ها؛**

از دیگر باکتری های بی هوازی اختیاری گروه باسیلی ها مانند گونه های باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، باسیلوس لیچنی فورمیس (*Bacillus licheniformis*) باسیلوس کرئوس (*Bacillus cereus*) و باسیلوس سیرکولنس (*Bacillus circulans*) می باشد. تعداد این گروه از باکتری ها کم و مشابه با تعداد باکتری های موجود در خوراک است. همچنین، تعداد اسپور در این گروه از باکتری ها در شکمبه کمتر از خوراک مصرفی بوده که می تواند بیانگر رشد آنها در شکمبه باشد. این دسته از باکتری ها با مصرف پروتئین بیشتر شده و نقش موثری در تجزیه پذیری پروتئین بازی می نمایند.

- **پروپیونوباکتریوم ها؛**

این دسته از باکتری ها با بکارگیری محیط کشت لاکتات شناسایی و بررسی شدند. تعداد این گروه از باکتری ها برعکس سایر گروه های باکتریای بی هوازی اختیاری، گسترده تر بوده و جمعیت آنها همواره تابع خوراک مصرفی و اقلیم پرورشی دام بوده است. این باکتری ها تجزیه کننده پروتئین و تولید کننده اسید لاکتیک و پروپیونیک می باشند. از باکتری های مهم این گروه می توان گونه کورینه باکتریوم اکنز (*Corynebacterium acnes*) و پروپیونوباکتریوم اکنز (*Propionibacterium acnes*) را نام برد. تعداد کورینه باکتریوم شناسایی شده در هر میلی لیتر مایع شکمبه بالای ۱۰ میلیون عدد تخمین زده شده است.

- **استرپتوکوکوس ها؛**

معروف ترین گونه باکتریایی مربوط به کشت های بی هوازی اختیاری استرپتوکوکوس بوویس (*Streptococcus bovis*) است، که در این گروه قرار دارد. استرپتوکوکوس بوویس یک باکتری آمیلولایتیک بوده و با افزایش خوراک دانه ایی یا مواد متراکم، و همزمان با افزایش بروز نفخ به صورت معنی داری ازدیاد می یابد. تعداد استرپتوکوکوس بوویس ها در محیط شکمبه بین محدوده ۰/۲ تا ۱۴۰ میلیون در هر میلی لیتر مایع شکمبه متغیر می باشد. اما باکتری های استرپتوکوکوس لیکوفاسینس (*Streptococcus liquefaciens*)، استرپتوکوکوس فائکالیس (*Streptococcus faecalis*) و سایر استرپتوکوکوس های غیر آمیلولایتیک که در این گروه جای می گیرند، تغییرات معنی داری در شکمبه ندارند. این باکتری ها از هفته پنجم تولد در دستگاه گوارش دام های جوان دیده می شوند. همچنین دسته ایی از کوکسی ها هستند که با مشخصات استرپتوکوکوس ها در شکمبه ظاهر و رشد می نمایند. بطور مثال پدی کوکوس ها (*Pediococcus*) یا گروه های سارسینا بکری (*Sarcina bakeri*) با تعداد بسیار کمتری در شکمبه زیست می کنند و با مصرف خوراک دانه ایی در حد معنی داری افزایش می یابند. البته رشد این دسته از باکتری ها تاثیر معنی داری بر فرآیند تخمیر نمی گذارد و یا شناخته نشده است.

- **لاکتوباسیلوس ها؛**

لاکتوباسیلی ها همانند سایر گروه های دیگر قابلیت رشد کامل را در حضور اکسیژن دارند. گونه های متفاوتی در این دسته دیده می شود که مهمترین آنها شامل لاکتوباسیلوس برویس (*L. brevis*)، لاکتوباسیلوس فرمنتی (*L. fermenti*)، لاکتوباسیلوس بوچنری (*L. buchneri*)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*L. acidophilus*) و لاکتوباسیلوس کازئی (*L. casei*) می باشد. تعداد حضور این گروه از باکتری ها به شدت تابع نوع قند مصرفی می باشد. بطور مثال؛ باکتری برویس بعد از مصرف گلوکز افزایش یافته و به ۱۵۰ میلیون در هر میلی لیتر مایع شکمبه

می رسد. اما با مصرف علوفه تعداد باکتری برویس کمتر شده و کلیه باکتری های نام برده شده بطور همزمان افزایش می یابند. به طور تقریبی این گروه از باکتری ها از روز ۱۰±۲۲ زایش گوساله، در دستگاه گوارش دیده شده اند.

۴-۳-۱-۲ باکتری های بی هوازی

این گروه از باکتری ها به دو بخش عمده میله ایی و کروی طبقه بندی می شوند. بخش میله ایی خود به دو گروه هاگ زا و غیر هاگ زا تقسیم می گردد. باکتری های بی هوازی قدرت انطباق کمتری در مقایسه با باکتری های بی هوازی اختیاری در برابر شرایط جدید دارند. اما کاربرد این باکتری ها در تخمیر مواد مغذی مهمتر می باشد.

- **باکتری های میله ایی هاگ زا؛**

اگر چه باکتری های بی هوازی بخش بسیار عمده ایی از باکتری های شکمبه را تشکیل می دهند، اما باکتری های میله ایی هاگ زا تعداد کم تری از این میکروارگانیسم ها را شامل می شوند. کارشناسان در جهت تشخیص این گروه از باکتری ها تحقیقات خود را برپایه باکتری های سلولایتیک میله ایی هاگ زا قرار داده بودند که متوجه کم اهمیت تر بودن آنها شدند. محدوده شمارش این باکتری ها در شکمبه بین ۱/۷-۱/۳ میلیون در هر گرم ماده خشک میکروبی تخمین زده می شود. کارشناسان تعداد هاگ های میله ایی مشاهده شده در شکمبه را به نوع خوراک مصرفی و هاگ اولیه موجود در آن وابسته دانسته و تغییرات جمعیتی آنان را در شکمبه بی معنی می دانند. محققین مهمترین باکتری هاگ زا را کلستریدیوم با گونه های (*Clostridium lochheadii*، *Clostridium longisporum*، *Clostridium butyricum*، *Clostridium kluyveri* و *Clostridium sporogenes*) معرفی می کنند.

- **باکتری های میله ایی غیر هاگ زا؛**

تنوع این گروه از باکتری در شکمبه فراوان بوده و سرعت شسته شدن آنها از شکمبه سریع است. این گروه از باکتری ها و جمعیت آنها به شدت تابع شرایط پرورشی و نحوه خوراک مصرفی می باشد. حضور باکتری های میله ای غیرهاگ زا در تخمیر بی هوازی بسیار مهم و اساسی می باشد. دستکاری شکمبه بیشتر در این گروه از باکتری ها جای می گیرد. مهمترین باکتری های این گروه عبارتنداز؛ لاکتوباسیلی (*Lactobacilli*)، رامی باکتریا (*Ramibacteria*)، ائوباکتریا (*Eubacteria*)، دسولفوویبریو (*Desulfovibrivibrio*)، سیلوباکتریا (*Cillobacteria*)، متانوباکتریا (*Methanobacteria*)، لاچنوسپیرا (*Lachnospirae*)، فزوباکتریا (*Fusobacteria*)، بوتیری ویبریو

(*Butyrivibrio*)، سلنوموناس (*Selenomonas*)، سوکسینوویبرو (*Succinivibrio*)، بورلیا (*Borrelia*)، سوکسینوموناس (*Succinimonas*)، باکتری های تولید کننده اسید سوکسینیک (*Succinic acid-producing Bacteroides*)، باکتری های تولید کننده اسید بوتیریک (*Butyric acid-producing Bacteroides*) و باکتری های انحناء دار و متحرک (*Bcteria motile and Curved rods*) می باشد. هر یک از باکتری های فوق دارای چند گونه باکتری در زیر مجموعه خود می باشند. باکتری های غیر هاگ زا همانند گروه های هاگ زا به راحتی از یک نشخوارکننده به نشخوارکننده بعدی منتقل می شوند و به طور تقریبی از سن ۳ تا ۶ هفتگی بعد از تولد به تدریج در دام های جوان افزایش می یابند.

- **باکتری های کروی؛**

این گروه از باکتری ها با تنوع کمتری در شکمبه زیست نموده و می توانند بر تخمیر مواد مغذی نقش اساسی بازی نمایند. پپتواسترپتوکوکسی (*Peptostreptococci*)، رومینوکوکسی (*Ruminococci*) و ویلونلا (*Veillonellae*) سه جنس اصلی با گونه های مختلف در شکمبه محسوب می شوند. باکتری های کروی تقریبا از سن ۳ هفتگی در دستگاه گوارش دام جوان دیده شده و از سن ۶ هفتگی فعالیت عمده خود را آغاز می نمایند. بارزترین گونه های معروف باکتری های پپتواسترپتوکوکسی در شکمبه شامل *P. intermedius* ، *P. elsdenii* و *P. lanceolatus* می باشد. همچنین *R. flavefaciens* ،*R. flavefaciens* و *R. albus* گونه های مهم رومینوکوکسی و *V. gazogenes* همراه با *V. alcalescens* اصلی ترین گونه های ویلونلا در شکمبه محسوب می شوند. جمعیت باکتری های کروی در شکمبه به نسبت کمتر از باکتری های میله ایی بوده و نقش فعالیتی آنها محدودتر می باشد.

۲-۳-۴ طبقه بندی باکتری ها براساس گروه فعالیتی

می توان گفت مهمترین عامل تشکیل یک جمعیت میکروبی در مخزن تخمیر، تماس دام ها با یکدیگر و ماده غذایی مورد مصرف می باشد. لذا اکثر کارشناسان بر این باور هستند که صحیح ترین روش طبقه بندی میکروارگانیسم های شکمبه نوع ماده اولیه ای است که باکتری ها به آن می چسبند. لذا در این روش باکتری ها به ۱۰ گروه عمده (هضم کننده سلولز، هضم کننده نشاسته، هضم کننده همی سلولز، هضم کننده پکتین، تخمیر کننده قند، مصرف کننده اسید، تولید کننده متان، تجزیه کننده پروتئین، تخمیر کننده آمونیاک و اوره و تجزیه کننده چربی) تقسیم می شوند. البته به دلیل همپوشانی در بیشتر گونه های باکتریایی، به دلیل استفاده از چند ماده غذایی توسط یک باکتری، کارشناسان از

سایر خصوصیات باکتری در جهت طبقه بندی استفاده می کنند. نکته قابل توجه این است که در صورت فقدان اطلاعات لازم درباره جنس و گونه باکتری (بطور مثال؛ می توان به اشریشیاکلی اشاره نمود که اشریشیا جنس و کولی گونه ای که باکتری در آن طبقه بندی شده است، می باشد) کشت باکتری ها به عنوان سویه در نظر گرفته می شود. در این حالت، طبقه بندی باکتری ها بیشتر براساس جداسازی فیزیکی یک میکروارگانیسم از کلونی صورت می گیرد و تشابهی بین سویه های یک باکتری در دو کلونی مجزا وجود نخواهد داشت. البته احتمال دارد که تفاوتی بین سویه ها دیده نشود، اما احتمالاً در معیارهای وسیع تر تفاوت بین سویه ها دیده خواهد شد.

۴-۳-۲-۱ باکتری های هضم کننده سلولز

اولین گونه باکتریایی هضم کننده سلولز ۸ روز بعد از تولد نتاج در دستگاه گوارش دام های جوان دیده می شوند. آنزیم اصلی این باکتری ها سلولاز می باشد، که خرد کننده پیوندهای ۴-۱ بتا سلولز می باشند. فعالیت این آنزیم به مقدار کمتری در محتویات شکمبه اتفاق افتاده و بیشتر درون یک مخزن گوارشی تولید شده توسط باکتری- ماده غذایی رخ می دهد. تولیدات مهم تخمیری ناشی از فعالیت باکتری های هضم کننده سلولز اسید سوکسنیک، اسید استیک، اسید فرمیک، هیدروژن و دی اکسیدکربن می باشد. مهمترین گونه های هضم کننده سلولز در شکمبه فیبروباکتر سوکسینوژنز (*Fibrobacter succinogenes*)، رومینوکوکوس فلاوفاسینس (*Ruminococcus flavefaciens*)، رومینوکوکوس آلبوس (*Ruminococcus albus*) و بوتیر ویبریو فیبروسولونس (*Butyrvibrio fibrisolvens*) می باشد. اما گونه های ضعیف تری مانند کلستریدیوم ها، سیلوباکتریوم سلوسولونس (*Cillobacterium celluosolvens*)، میکرومونوسپورا (*Micromonospora*) و فوزوباکتریوم پلی ساکارولیتیکوم (*Fusobacterum polysaccharolyticum*) در شکمبه دیده می شود، که براساس شرایط پرورشی و اقلیم آب و هوایی تعداد آنها به شدت متغیر خواهد بود. مشاهده شده است وقتی سلولز در حضور گونه های متعددی از باکتری ها قرار می گیرد، به شکل موثرتری تجزیه می شود. در حالیکه در کشت های خالص باکتریایی تجزیه سلولز کمتر صورت می گیرد. باکتری های هضم کننده سلولز همانند سایر باکتری ها جهت فعالیت خود نیاز به اسیدهای چرب شاخه دار و اسیدهای چرب بدون شاخه ۵ تا ۸ کربنه نیازمند بوده و این اسیدها می توانند به عنوان اسکلت کربنی مورد استفاده باکتری ها جهت سنتز بعضی اسیدهای آمینه مانند والین، لوسین و ایزولوسین قرار گیرند. همچنین، دسته ای از باکتری های هضم کننده سلولز به ویتامین های اسید فولیک، پیریدوکسین، ریبوفلاووین، تیامین، کوبالآمین، بیوتین و پارآآمینوبنزوئیک اسید (PABA) نیازمند می باشند.

در ارتباط با نیاز مواد معدنی، کارشناسان مهمترین مواد معدنی مورد نیاز باکتری ها را به ترتیب سدیم، پتاسیم، نیتروژن، کلسیم، منیزیوم، فسفات و گوگرد عنوان می نمایند. سدیم برای رشد اکثر باکتری های غالب شکمبه مورد نیاز بوده و فقدان آن سبب کاهش تخمیر مواد مغذی می شود. مصرف نیتروژن و دی اکسیدکربن از دسته مواد حیاتی در رشد و توسعه باکتری های هضم کننده سلولز اهمیت بسزایی دارند.

- **فیبروباکتر ساکسینوژنز؛**

این باکتری اولین بار در سال ۱۹۴۷ از شکمبه دام ها جداسازی شد. این باکتری میله ایی شکل(گاهی براساس سن کشت متورم و کروی دیده می شود)، بی حرکت، فاقد هاگ با رنگ آمیزی گرم منفی و با اندازه متغیر (۱ تا ۲ نانومتر طول و ۰/۳ تا ۰/۴ نانومتر عرض و یا ۰/۸ تا ۱/۶ نانومتر قطر در حالت کروی) دیده می شود. وجود اشکال متفاوت از خصوصیات های قابل بررسی این باکتری می باشد. سویه های متعددی از این گونه باکتریایی توسط محققین در دهه ۵۰ شناسایی شده است، که امروزه توسط فن آوری های فیلوژنتیکی (با استفاده از توالی اسید نوکلئیک ریبوزومی 16S) سویه های مختلف آن به طور مناسب تر بررسی شده است. گونه فیبروباکتر سوکسینوژنز در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد بهترین رشد را بر روی سلولز، سلوبیوز و گلوکز خواهد داشت. اما سویه های دیگر این باکتری بر روی پکتین، مالتوز، لاکتوز، تره هالوز، دکسترین و نشاسته فعالیت می کنند. این باکتری دارای دامنه اسیدیته محدود (بین ۶/۹ تا ۷/۴) و در اسیدیته بالا غیرفعال می شود.

برای رشد این گونه باکتریایی اسید والریک، ایزوبوتیرات، بیوتین و PABA همراه با آمونیاک و دی اکسیدکربن حیاتی می باشد. این باکتری فعالترین گونه هضم کننده سلولز محسوب شده و بیشترین هضم سلولز را در کشت های خالص داشته است. میزان آنزیم سلولاز ترشح شده از این باکتری همواره ثابت و میزان تجزیه سلولز به نوع فرآوری خوراک وابسته می باشد. بطور مثال؛ سلولز با ساختار کریستالی تجزیه کمتری را در مقایسه با سلولز بدون شکل (خرد شده) می پذیرد. تولیدات نهایی باکتری فیبروباکتر سوکسینوژنز عمدتا اسید استیک و اسید سوکسینیک می باشد.

- **رومینوکوکوس فلاوفاسینس؛**

براساس خصوصیات ریخت شناسی این گونه باکتریایی کروی شکل (زنجیره ایی هشت عددی یا جفتی)، بی حرکت، با رنگ آمیزی گرم متغیر (مثبت و یا منفی) و غیر هاگ زا می باشد. اندازه این باکتری ها از ۰/۸ تا ۱/۶ نانومتر قطر متفاوت و گاه به صورت کروی نامتقارن (کروی- میله ای) دیده می شوند. رومینوکوکوس ها قبل از تقسیم تا حدی میله ایی شکل بنظر می رسند. رومینوکوکوس فلاوفاسینس هرگز چهارتایی مکعبی دیده نشده و عمدتا به صورت زنجیره ای دیده می شوند. باکتری

فلاوفاسینس قابلیت تولید رنگدانه های زرد را براساس نوع ماده غذایی مصرفی دارد. این گونه باکتریایی تا دمای ۴۵ درجه سانتیگراد را تحمل و در شکمبه دارای تراکم بالایی می باشد. کوکسی های فلاوفاسینس تنها سلولز، سلوبیوز و مقدار ناچیزی گلوکز را تجزیه می کنند و اسید سوکسینیک، فورمات، استات و مقدار کمی اسید لاکتیک تولید می نمایند. این گونه باکتریایی قادر به تولید گاز و اتانول نمی باشد. فاکتورهای اساسی رشد شناسایی شده برای این گونه باکتریایی اسیدایزووالریک، آمونیاک، دی اکسیدکربن، اسید فولیک، بیوتین، PABA، آدنین و گوانین است. این باکتری دارای سویه های زیادی می باشد که نوع سویه موجود در مخزن تخمیری حیوانات سردسیر قادر به تجزیه زایلان و پکتین می باشد. از مهمترین معیارهای تشخیص گونه رومینوکوکوس فلاوفاسینس از گونه آلبوس تشکیل زنجیره باکتریایی همراه با تولید اسید سوکسینیک خواهد بود.

- **رومینوکوکوس آلبوس؛**

این گونه باکتریایی همانند گونه فلاوفاسینس کروی، بی حرکت، با رنگ آمیزی گرم منفی و مثبت و گاهی کپسول دار مشاهده می شود. اندازه قطر این باکتری ۰/۸ تا ۲ نانومتر متفاوت بوده و در هنگام تقسیم سلولی میله ای شکل خواهد بود. رومینوکوکوس آلبوس همانند گونه فلاوفاسینس دارای غشای گلایکوکالیکس پیشرفته ای است. این غشاء اجازه اتصال فراوان و قدرتمند باکتری را به مواد مغذی امکان می سازد. درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی گراد آستانه رشد باکتری محسوب شده و رشد مطلوب آنها در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد اتفاق می افتد. دامنه اسیدیته این باکتری همانند سایر کوکوس ها محدود و اسیدیته ۶/۱ مطلوب ترین اسیدیته برای رشد آلبوس محسوب می شود. پایین آمدن اسیدیته به زیر ۶ سبب شسته شدن باکتری از مخزن تخمیر می گردد. از لحاظ ظاهری باکتری آلبوس معمولا به صورت انفرادی و جفتی دیده می شود. کلونی این باکتری همانند کلونی گونه رومینوکوکوس فلاوفاسینس به رنگ زرد دیده می شود. از بهترین معیارهای تشخیص این گونه باکتریایی در مقابل گونه فلاوفاسینس تولید گاز و اتانول همراه با مقدار کم اسید سوکسینیک می باشد. از دیگر معیارها فقدان قدرت تشکیل زنجیره در این باکتری است. این باکتری سلولز، سلوبیوز و گزیلان را تجزیه نموده و معمولا گلوکز و قندهای دیگر را تخمیر نمی کنند.

- **بوتیر ویبریو فیبری سولونس؛**

باکتری بوتیری ویبریو فیبری سولونس در سال ۱۹۵۰ اولین بار از شکمبه جدا شده است. این باکتری میله ای شکل و گاهی با انحنای جزئی، متحرک، دارای یک یا چند تاژک در قطبین (گاهی بدون قطب)، با رنگ آمیزی گرم منفی (خصوصیات گرم مثبت هم از خود نشان می دهند) که تشکیل زنجیره زیگزاگی داده و غیر هاگ زا می باشند، دیده می شود. اندازه این باکتری به صورت تقریبی ۲ تا 5

نانومتر طول و ۰/۴ تا ۰/۶ نانومتر عرض می باشد. درجه حرارت مورد نیاز جهت رشد برای این باکتری ۳۷ درجه سانتی گراد و اسیدیته مطلوب برای حداکثر شدن کارآیی آن ۷ پیشنهاد شده است. این باکتری از سلولز، هگزوزها، پنتوزها، گزیلان و نشاسته استفاده نموده و در حضور استات و اسیدهای آمینه رشد آنها تحریک می شود. حضور پیریدوکسین، اسید فولیک و بیوتین برای رشد ضروری فرض شده و مهمترین تولیدات این باکتری در تخمیر اسید بوتیریک می باشد. البته استات، فورمات و لاکتات همراه با هیدروژن از دیگر تولیدات تخمیری این باکتری می باشد. تحقیقات نشان می دهد این باکتری در مقابل باکتری فیبرو سوکسینوژنز از سرعت کمتری در تجزیه سلولز برخودار است. این در حالی است که در علوفه هایی با پروتئین کم قابلیت هضم مناسب سلولز را در مقابل سایر باکتری ها دارد. این باکتری برخلاف سایر باکتری ها برای رشد به دی اکسیدکربن و آمونیاک نیاز چندانی نداشته و نشاسته و سایر کربوهیدرات ها را تخمیر می کند. محصولات تخمیری عمده این باکتری ها اسید فرمیک، بوتیریک، لاکتیک، دی اکسیدکربن، اتانول و هیدروژن است. از خصوصیات ویژه این باکتری ها فقدان تولید ایندول، عدم توانایی مایع کردن ژلاتین و احیاء نکردن نیترات می باشد. از دیگر خصوصیات ویژه وجود پلاسمید (اندامک خارج سلولی حاوی DNA که قادر است از یک یاخته به یاخته دیگر انتقال دهد) در این باکتری ها است.

- **کلستریدیوم های تجزیه کننده سلولز؛**

این گونه باکتریایی میله ای، گرم مثبت، هاگ زا، با اندازه های متغیر (طول ۷ تا ۱۵ نانومتر و عرض ۰/۷ تا ۱/۷ نانومتر) و غیر متحرک محسوب می شود. هر چند در تعداد کمی از آنها خاصیت حرکت با تاژک هایی که اطراف آنها را پوشانده، دیده می شود. گونه های اصلی شناسایی شده کلستریدیوم ها عبارتنداز لوکدی (*C. lochheadii*)، لانجیس پوروم (*C. longisporum*)، سلوبیوپاروم (*C. Cellobioparum*)، پلی ساکارولیتیکوم (*C. Polyssacharolyticum*)، ایروتولرانس (*C.aerotolerans*)، استیک لندی (*C. sticklandii*)، آمینوفیلوم (*C. aminophilum*) و کارتاتابیدوم (*C. Chartatabidum*) می باشد. همچنین، گونه های پرفرینگنز (*C. perfringens*) و بوتیریکوم (*C. butyricum*) که قابلیت تجزیه گیاه میموزا را داشته و گونه بیفرمنتانس (*C. bifermentans*) در دام های جوان خاصیت تجزیه پروتئین را از خود نشان داده اند، مشاهده می شوند. این گونه باکتریایی سلولز را به سرعت هضم نموده و به استات، فورمات، بوتیرات، دی اکسیدکربن و اتانول تبدیل می کند. جمعیت کلستریدیوم ها در شکمبه کم بوده و اهمیت چندانی ندارند.

- **سیلوباکتریوم سلولوسولونس؛**

سیلوباکتریوم ها یا ائوباکتریوم سلولوسولونس (*Eubacterium cellulosolvens*) میله ای شکل با انتهای برآمده، دارای مژک های فراوان در تمامی نقاط بدن (*Peritrichous*)، متحرک، در کشت های جوان گرم مثبت و در کشت های مسن گرم منفی می باشد. در این باکتری ها زنجیره باکتری نیز دیده می شود و طول هر باکتری ۰/۷ تا ۳ نانومتر و عرض آنها ۰/۵ تا ۱/۲ نانومتر متغیر است. با وجود آنکه سرعت هضم سلولز توسط این گونه باکتریایی سریع می باشد، بدلیل تعداد کم این گونه باکتریایی در شکمبه محققین اهمیت آنها را کم در نظر می گیرند. سلولز و سلوبیوز اصلی ترین مواد غذایی مورد مصرف این باکتری محسوب شده و عمده تولید آنها در تخمیر اسید لاکتیک و گازها می باشد.

۲-۲-۳-۴ باکتری های هضم کننده نشاسته

باکتری های هضم کننده نشاسته زمانی در شکمبه غالب می شوند که نشخوارکنندگان موادی سرشار از غلات یا خوراک فرآوری شده با سرعت عبور زیاد از مخزن تخمیر مصرف نمایند. تجزیه نشاسته بر خلاف سلولز توسط آنزیم خارج یاخته (آلفا آمیلاز) تجزیه می شوند. این آنزیم به صورت تصادفی به مواد نشاسته ایی حمله و زنجیره گلوسیدی آنها را تجزیه می کنند. عمده تولیدات تخمیری در این گونه های باکتریایی پروپیونات، لاکتات، سوکسینات، استات و بوتیرات به ترتیب می باشد. تعدادی از گونه های هضم کننده سلولز و همی سلولز قابلیت خرد کردن نشاسته را دارا هستند. با وجود گسترده بودن حضور باکتری ها در این گروه، گونه های معروف این دسته از باکتری ها شامل رومینوباکتر آمیلوفیلوس (*Ruminobacter amylophilus*)، استرپتوکوکوس بوویس (*Streptococcus bovis*)، سوکسینوموناس آمیلولیتیکا (*Succinimonas amylolytica*)، میتسوکلا مولتی اسیدوز (*Mitsuokella multiacidus*) و سلنوموناس رومینانتیوم (*Selenomonas ruminantium*) می باشد. همچنین، باکتری هایی هستند که قدرت تجزیه نشاسته را دارند اما در صورت وجود ماده غذایی مورد نیاز خود آن را به نشاسته ترجیح می دهند. بطور مثال؛ سوکسینوویبریو دکسترینوسولونس (*Succinivibrio dextrinosolvens*) دکسترین و پروتلا رومینوکولا (*Prevotella ruminicola*) همی سلولز پروتئین را به نشاسته ترجیح می دهد. و یا فیبروباکتر سوکسینوژنز، بوتیری ویبریو و کلستریدیوم ها نشاسته را تجزیه می کنند، ولی سلولز را به آن ترجیح می دهند.

باکتری های هضم کننده نشاسته همانند باکتری های هضم کننده سلولز به دی اکسیدکربن و آمونیاک وابستگی حیاتی دارند. همچنین، این باکتری ها به مواد معدنی، اسیدهای چرب شاخه دار و دسته ایی از ویتامین ها مانند بیوتین نیازمند بوده و در صورت وجود اسیدهای چرب فرار و تعدادی از

ویتامین های B کمپلکس تحریک می شوند. این باکتری ها نشاسته، مالتوز و گلوکز را به عنوان ماده اصلی غذایی انتخاب نموده و تجزیه می کنند.

- **رومینوباکتر آمیلوفیلوس؛**

نام این باکتری در سابق باکتریوئیدس آمیلوفیلوس (*Bacteroides amylophilus*) بوده که توسط محققین در سال ۱۹۵۶ از شکمبه جداسازی شده است. این باکتری ها میله ایی شکل و بی تحرک هستند. اندازه آنها متغیر (طول ۱/۵ تا ۴ نانومتر و عرض ۰/۸ تا ۱/۵ نانومتر) و غیر هاگ زا می باشند. در طی رنگ آمیزی به صورت گرم منفی دیده می شوند و گاه به صورت کروی هم مشاهده می شوند. دامنه درجه حرارت مطلوب برای فعالیت این گونه باکتریایی بین ۳۶ تا ۴۴ درجه سانتی گراد است. اسیدیته مورد نیاز این باکتری ها بین ۶/۵ تا ۷/۸ متغیر است. این باکتری ها به صورت اختصاصی نشاسته و مالتوز را تخمیر نموده و در بعضی از سویه های آنها تجزیه پروتئین و چربی هم دیده شده است. ملکول های نشاسته توسط این باکتری به داخل یاخته برده شده و هیدرولیز می گردد. این گونه باکتریایی قدرت مایع سازی ژلاتین را داشته و قدرت احیا کردن نیترات و تولید ایندول را ندارد. این باکتری برای رشد به گازکربنیک و آمونیاک وابسته بوده و در طی تخمیر مواد غذایی استات، فورمات، اتانول و اسید سوکسینیک تولید می نماید.

- **استرپتوکوکوس بوویس؛**

این گونه باکتریایی گرم مثبت، غیر متحرک و کروی شکل تا تخم مرغی می باشد. اندازه باکتری متغیر و قطر آن بین ۰/۶ تا ۰/۹ نانومتر اندازه گیری شده است. اکثر اوقات باکتری ها به صورت یک زنجیره مشاهده می شود و در سنین بالاتر دارای رنگ آمیزی گرم منفی می باشند. کلونی های این باکتری به رنگ های متفاوت زرد، نارنجی و قرمز دیده می شود. مهمترین مواد غذایی مورد تجزیه توسط این باکتری نشاسته و گلوکز می باشد. این باکتری تک محصولی و براحتی بدلیل پتانسیل اکسید-احیای پایین از شکمبه جدا می شوند. جمعیت باکتری های بوویس در شکمبه فراوان بوده و در صورت مصرف مواد متراکم دانه ایی افزایش چشمگیری خواهد داشت. از آنجا که این باکتری در مواد غذایی مصرفی وجود ندارد و یا به مقدار بسیار اندک حضور دارند، از باکتری های حقیقی شکمبه محسوب می شوند. از مهمترین مشخصه های این باکتری عدم قدرت مایع سازی ژلاتین می باشد. این باکتری بر اکثر کربوهیدرات ها بخصوص نشاسته فعالیت نموده و اسید لاکتیک، فورمات، گازکربنیک و مقدار کمی استات تولید می نماید. اسیدوز ناشی از حضور زیاد لاکتات می تواند توسط این باکتری صورت گرفته باشد. باکتری بوویس بجز بیوتین به ویتامین دیگری نیاز نداشته و برای رشدشان اسیدآمینه آرژنین حیاتی می باشد. حضور اسیدهای چرب شاخه دار، آمونیاک، اسید پانتوتنیک و تیامین محرک رشدی آنها

خواهد بود. رشد این باکتری ها در هنگام حضور علوفه بالا در جیره بطئی و در محیط اسیدی رشد بهتری از خود نشان می دهند.

- **سلنوموناس رومینانتیوم؛**

باکتری رومینانتیوم در سال ۱۸۹۰ از شکمبه نشخوارکنندگان جداسازی شد. از لحاظ ریخت شناسی دارای تاژک، انحناء دار، میله ای و گاه هلالی شکل، دارای اندازه های متغیر (با طول ۵ تا ۱۱ نانومتر و عرض ۱/۵ تا ۳/۱ نانومتر) و متحرک می باشد. از لحاظ رنگ آمیزی در ردیف گرم منفی ها قرار گرفته و تاژک های آنها بیشتر در قطبین قرار می گیرد. عمده فعالیت رومینانتیوم بر روی نشاسته و تعدادی ازکربوهیدرات ها بوده و در بعضی از سویه ها مانند لاکتیلیتیکا (*Lactilytica*) تجزیه گلیسرول و لاکتات و در سلنوموناس رومینانتیوم بریانتی (*Brayanti*) تجزیه اوره دیده می شود. جمعیت این باکتری ها در هنگام مصرف غلات افزایش یافته و تا ۲۲ الی ۵۱ درصد از جمعیت باکتری ها قابل تغییر است. این میزان از جمعیت نشان دهنده اهمیت سلنوموناس رومینانتیوم در هضم غلات و نشاسته آنها می باشد. محصول عمده این باکتری در تخمیر شکمبه اسید لاکتیک بوده و در حد متوسط استات و پروپیونات و در میزان کمتر سوکسینیک، فورمات و بوتیرات تولید می نماید. در بعضی از سویه های این باکتری تولید دی اکسیدکربن اتفاق می افتد و در بعضی سویه های آن نیاز به دی اکسیدکربن جلوه می کند. در نهایت وجود دی اکسیدکربن، پاراآمینو بنزوئیک اسید، آسپارتات، گروه ویتامینی B و والرات برای رشد این باکتری حیاتی می باشد. برای رشد بهتر این باکتری اسیدهای چرب شاخه دار (بخصوص والریک)، بیوتین و مواد معدنی همراه با آمونیاک حیاتی می باشد. درجه حرارت مناسب برای رشد رومینانتیوم بین ۳۴ تا ۴۰ درجه سانتی گراد پیشنهاد شده است. حداقل اسیدیته مورد تحمل این باکتری ۴/۳ بوده و در اسیدیته های پایین باکتری رشد بهتری نشان می دهد. باکتری مزبور به میزان اندکی در مقابل اکسیژن از خود مقاومت نشان می دهد و اکسیژن را به پرواکسید هیدروژن تبدیل می نماید. مشخصه های بارز این باکتری تولید سولفید هیدروژن، تولید ایندول و کاتالاز می باشد. رومینانتیوم قدرت مایع کردن ژلاتین و احیا کردن نیترات را ندارد.

- **سوکسینوموناس آمیلولیتیکا؛**

جنس و گونه این باکتری در سال ۱۹۵۸ شناسایی گردید. این باکتری به شکل های متفاوتی ظاهر می شود. شکل میله ایی آنها دارای طول ۲ تا ۳ نانومتر و عرض ۱ تا ۱/۵ نانومتر و شکل کروی آنها بین ۲/۵ تا ۳/۵ نانومتر قطر دارد. این باکتری ها گرم منفی، غیر هاگ زا، متحرک و دارای تاژک های قطبی می باشد. درجه حرارت مطلوب برای رشد باکتری بین ۳۵ تا ۳۸ درجه سانتی گراد عنوان شده است. عمده مواد غذایی مورد مصرف باکتری نشاسته، مالتوز، گلوکز و دکسترین بوده و آنها را به اسید

سوکسینیک و به مقدار کمتری استات و پروپیونات تخمیر می کند. این باکتری هم قادر به احیای نیترات، مایع سازی ژلاتین و تولید سولفید هیدروژن، ایندول و کاتالاز نیست. جمعیت این گونه باکتریایی کم و وجود دی اکسیدکربن همراه با آمونیاک برای رشد آنها حیاتی می باشد.

- **میتسوکلا مولتی اسیدوز؛**

از آنجا که این گونه باکتریایی مشابهت زیادی با سلنوموناس رومینانتیوم داشته است، تا این اواخر کارشناسان هر دو را یک گونه میکروبی می پنداشتند. اما از زمان بکارگیری معیارهای ژنتیکی در تعیین توالی اسید نوکلئیک ریبوزومی ۱۶s،گونه میتسوکلا از گونه سلنوموناس جدا گردید. این باکتری میله ای شکل، بدون تاژک، غیر متحرک و گرم منفی در شکمبه و روده گیاه خواران مشاهده می شود. این باکتری تقریبا ناشناخته و اطلاعات کمی در این زمینه موجود است. مواد مغذی مورد نیاز این باکتری و محصولات تولیدی آن مشابه با باکتری سلنوموناس رومینانتیوم می باشد.

۳-۲-۳-۴ باکتری های هضم کننده همی سلولز

علاوه بر سلولز، پلی ساکارید مهم دیگری به نام همی سلولز (۲۰ تا ۳۰ درصد از ساختارهای علوفه مصرفی را شامل می گردد) در طبیعت مشاهده می شود که به مقدار قابل توجهی در خوراک دام های نشخوارکننده وجود دارد. عموما، باکتری های تجزیه کننده سلولز می توانند همی سلولز را تجزیه نمایند. اما براساس اینکه باکتری فیبروباکتر سوکسینوژنز نتوانست همی سلولز را تجزیه نماید، باکتری های تجزیه کننده همی سلولز از سلولز جدا طبقه بندی شدند. براساس همین مطالعات کارشناسان گونه های خاصی از باکتری ها را از شکمبه جدا نمودند که باکتری های غالب هضم کننده همی سلولز می باشند. این باکتری ها عبارتنداز باکتریوئیدس آمیلوژنز (*Bacteroides amylogenes*)، پروتلا رومینوکولا (*Prevotella ruminicola*)، بوتیرویبریو فیبروسولونس (*Butyrvibrio fibrisolvens*)، گونه های رومینوکوکوس و گونه های ائوباکتریوم که اهمیت چندانی ندارند، هستند. سویه های زیادی در این گروه از باکتری ها مورد مطالعه قرار گرفتند، اما به دلیل همپوشانی با سایر گروه ها در طبقه بندی ذکر شده وارد نشدند. تولیدات نهایی باکتری های هضم کننده همی سلولز بوتیرات، فورمات، اتانول، هیدروژن، استات، لاکتات و سوکسینات می باشد. این گونه ها در حضور اسیدهای چرب شاخه دار و بعضی ویتامین ها مانند بیوتین و اسیدفولیک تحریک به رشد می شوند. از آنجا که خصوصیات بعضی از گونه های میکروبی موجود در این گروه در مباحث قبلی تشریح شده است، در این جا فقط به تشریح بعضی از گونه های مورد اشاره می پردازیم.

- **پروتلا رومینوکولا؛**

نام دیگر این گونه باکتریایی باکتریوئیدس رومینوکولا (*Bacteroides ruminicola*) می باشد، که در سال ۱۹۵۷ از شکمبه جداسازی شده است. پروتلا رومینوکولا همانند باکتری های پروتلا برویس (*P. brevis*)، پروتلا بریانتی (*P. bryantii*) و پروتلا آلبنسیس (*P. albensis*) تمامی از زیر گروه های باکتری های پروتلا محسوب می شوند. این باکتری میله ای شکل تا کروی- میله ای به طول ۱ تا ۸ نانومتر و عرض ۰/۷۵ تا ۱ نانومتر و با رنگ آمیزی گرم منفی مشاهده می شود. عدم تحرک، جمعیت بالای آن در شکمبه و سایر نقاط تخمیری و اشکال متغیر آن از دیگر خصوصیات قابل توجه این باکتری می باشد. از ویژگی های مهم دیگر این باکتری مایع کردن ژلاتین و فقدان قدرت تولید گاز توسط آن است. پروتلا اکثر کربوهیدرات های محلول را (گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، سلوبیوز، مالتوز، ساکاروز، دکسترین، اینولین، پکتین، گزیلان، آرابینوز و گزیلور) تجزیه نموده و نشاسته را هیدرولیز می نماید. اما این باکتری قدرت تجزیه سلولز را نداشته و از آمونیاک و پپتیدها به جای آمینواسید در سنتز پروتئین استفاده می نماید. محصولات تخمیری به جا مانده از فعالیت آنها بیشتر اسید سوکسینیک، فرمیک، استیک و به مقدار ناچیزی اسید پروپیونیک است. دی اکسیدکربن و آمونیاک برای این گونه باکتریایی همراه با دو اسید آمینه متیونین و سیستئین برای بعضی از سویه ها حیاتی می باشد.

- **باکتریوئیدس آمیلوژنز؛**

این باکتری میله ای شکل، بدون تحرک، گرم منفی و به طول ۲/۵ تا ۳ نانومتر و عرض ۰/۴ تا ۰/۶ نانومتر مشاهده می شوند. این باکتری از گلوسیدها به خصوص گروه پنتوزها یک زنجیره گلوکزی ساخته و در درون یاخته آن را ذخیره می کند. این باکتری گلوکز، آرابینوز و گزیلان یا زایلان را تخمیر و اسید بوتیریک در حد فراوان و اسید استیک و سوکسینیک در حد کم تولید می نمایند.

- **گونه ائوباکتریوم ها؛**

این دسته از گونه های باکتریایی در دهه ۵۰ میلادی از شکمبه جداسازی و بررسی گردیدند. این باکتری ها گرم متغیر (در کشت های جوان گرم مثبت و در کشت های مسن تر گرم منفی می باشد)، غیر متحرک، زنجیره ای (زنجیره های کوتاه حداکثر ۲۰ یاخته) میله ای و گاهی کروی شکل هستند. اندازه این گروه از باکتری ها متغیر و طول و عرض آنها به ترتیب بین ۰/۷ تا ۱/۵ و ۰/۴ تا ۰/۷ متغیر می باشد. دامنه حرارتی این باکتری ها جهت فعالیت وسیع و بین ۲۲ تا ۵۰ درجه سانتی گراد می باشد. این گروه از باکتری ها همانند گونه سوکسینوموناس آمیلولیتیکا قادر به مایع سازی ژلاتین، احیای نیترات، تولید سولفید هیدروژن نیستند. اما از ویژگی های مهم آنها فقدان قدرت تخمیر نشاسته و سلولز می باشد. گونه های بیفورم (*E. biforme*)، لیموسوم (*E. limosum*) ایروفاسینس (*E. aerofaciens*)، رومینانتیوم (*E. ruminantium*)، یونیفرم (*E. uniforme*) اکسیدوردوکسنس (*E.*

(*oxidoreducens*) و زایلانوفیلوم (*E. xylanophilus*) از دسته ائوباکتریوم ها محسوب شده و این گونه ها همراه با سویه های شان توانایی مختلفی در تخمیر زایلوز، آرابینوز، مالتوز، دکسترین، سوکروز و زایلان از خود نشان داده اند. وجود این باکتری ها در تخمیر علوفه اهمیت خاصی دارد. محصول نهایی تخمیر ائوباکتریوم ها در شکمبه براساس نوع کربوهیدرات در حال مصرف متفاوت و بیشتر اسید فرمیک، استیک، بوتیریک و لاکتیک بوده و تولید اتانول و هیدروژن در بعضی سویه ها نیز دیده می شود. وجود آمونیاک جهت منبع نیتروژن و اسیدهای چرب شاخه دار (والریک، ایزووالریک، متیل بوتیریک و ایزوبوتیریک) برای رشد باکتری حیاتی می باشند.

۴-۲-۳-۴ باکتری های هضم کننده پکتین

پکتین از دسته کربوهیدرات های ساختمانی است که تقریبا ۱۰ تا ۱۵ درصد از خوراک مصرفی نشخوارکنندگان را شامل می شود. عموما پکتین از جنس یک پلی مر خطی از واحدهای اسید گالاکتورونیک با الکل متیل، گالاکتان و آرابان می باشد که توسط پیوندهای آلفا ۴-۱ به هم متصل شده اند. گروهی از باکتری های هضم کننده سلولز و بیشتر همی سلولز، در تجزیه پکتین مشارکت می کنند. این باکتری ها همراه با هضم کننده های انحصاری پکتین، پکتین ساختمانی را خواه در داخل زنجیره (اندوپکتات لیاز) و یا در پایان زنجیره (اگزوپکتات لیاز) تجزیه و آن را به استات، فورمات، لاکتات، دی اکسیدکربن، الکل و مقادیر کمی گاز تبدیل می کنند. مهمترین گونه های انحصاری هضم کننده پکتین شامل ترپونما بریانتی (*Treponema Beryantii*)، پپتو استرپتوکوکوس (*Peptostreptococcus*) لاچنوسپیرا مولتی پاروس (*Lachnospira multiparus*)، و گونه های اسپیروکت (*Spirochaetae spp*) می باشد. سایر باکتری های تجزیه کننده پکتین که به صورت همپوشان فعالیت می کنند عبارتنداز بوتیرویبریو فیبروسولونس (*Butyrvibrio fibrisolvens*)، باکتریوئیدس رومینوکولا (*Bacteroides ruminicola*)، باکتریوئیدس سوکسینوژنز (*Bacteroides succinogenes*)، سوکسینوموناس آمیلولایتیک (*Succinimonas amylolytic*)، سوکسینوویبریو دکسترینوسولونس (*Succinivibrio dextrinosolvens*) و استرپتوکوکوس بوویس (*Streptococcus bovis*) می باشد.

- **لاچنوسپیرا مولتی پاروس (مولتی پارا)؛**

جنس و گونه این باکتری در سال ۱۹۵۶ به صورت میله ای انحناء دار و گاه حلزونی، متحرک، طول ۲ تا ۴ نانومتر و عرض ۰/۴ تا ۰/۶ نانومتر، انتهای محدب، به صورت انفرادی یا جفتی و در حد پایین زنجیره ای، دارای یک تاژک در قطبین (*Monotrichous*) و با رنگ آمیزی متغیر (در کشت های جوان گرم مثبت و در کشت های مسن تر گرم منفی می باشد) شناسایی شده است. نیاز درجه حرارتی

این باکتری بین ۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد بوده و در طی تخمیر ایندول و سولفید هیدروژن تولید نمی کند. علاوه بر پکتین به تجزیه سلوبیوز، له ولوز، گلوکز و ساکاروز هم توجه خاصی دارد. تعداد این باکتری در هنگام مصرف علوفه لگومینه به طور معنی داری افزایش یافته و برای رشد لاچنوسپیرا حضور ویتامین های گروه B نیاز حیاتی می باشد. تولیدات تخمیری این باکتری دی اکسیدکربن، هیدروژن، اتانول، اسید استیک، فرمیک، لاکتیک، متانول و مقداری فورمات می باشد. این باکتری قابلیت تبدیل نیترات های غیر احیاء را به نیتریت دارد.

- **ترپونما بریانتی؛**

این گونه باکتریایی فنری یا مارپیچی شکل، متحرک با عرض ۰/۷ نانومتر و طول ۴ تا ۲۵ نانومتر در شکمبه دیده می شود. این باکتری در مقابل رنگ آمیزی گرم واکنشی از خود نشان نمی دهد. ترپونما علاوه بر تجزیه پکتین به تخمیر قندهای پنتوزی و هگزوزی مانند آرابینوز، گلوکز و ساکاروز، شبه چربی اینولین، اسیدهای اورونیک و نشاسته مبادرت می ورزد. اسیدهای سوکسینیک، استیک، فورمیک، لاکتیک، دی اکسیدکربن و الکل اتانول تولیدات تخمیری آنها در شکمبه محسوب می شود. این باکتری بوسیله جابجایی حذفی و یا هیدرولیز تجزیه می نماید. این باکتری به دلیل داشتن هر دو آنزیم تجزیه پکتین (لیاز) بسیار پر قدرت عمل می کند.

- **پپتواسترپتوکوکوس؛**

باکتری های گونه پپتواسترپتوکوکس به شکل کروی با قطر ۰/۹ تا ۱/۲ نانومتر، غیر متحرک، گرم مثبت و به شکل منفرد و گاه دوتایی هم دیده می شود. جمعیت تقریبی این باکتری ها در شکمبه کم می باشد. اما به دلیل سرعت بالای آنها در تخمیر پکتین و تبدیل آن به اسید استیک و هیدروژن اهمیت دارند. مهمترین گونه شناسایی شده در این زمینه پپتواسترپتوکوکوس آنایروبیوس (*P. anerobius*) می باشد. مقادیر کمی از الکل، اسید فرمیک و سایر اسیدهای تخمیری نیز در تخمیر این باکتری بر روی سلوبیوز، گلوکز و مالتوز دیده می شود. این باکتری دارای آنزیم خارج سلولی از نوع لیاز بوده و در تجزیه پروتئین ها هم کارآیی مناسب دارد. حضور این گونه باکتریایی به طور قطع مشخص و در روند طبیعی مرتعی این باکتری از ابتدای هفته دوم زایش در دستگاه گوارش دام جوان دیده می شود.

- **اسپیروکت ها؛**

دسته ای از باکتری های میله ای شکل، انحناء دار یا فنری شکل، متحرک، گرم منفی و با اندازه متغیر (طول ۵ تا ۱۵ نانومتر و عرض ۰/۵ تا ۱ نانومتر) که در دهه ۵۰ میلادی شناسایی شده اند و قابلیت تغییر اندازه و عبور از منفذهای کوچک را دارا می باشند. جمعیت این گونه باکتریایی ۱ تا ۶ درصد جمعیت باکتریایی شکمبه را تشکیل می دهد. این باکتری ها علاوه بر پکتین و زایلان از اکثر

کربوهیدرات های محلول مانند ال-آرابینوز، سوکروز و شبه چربی اینولین استفاده نموده و آنها را به اسید سوکسینیک، لاکتیک، استیک، فورمات، دی اکسیدکربن و الکل اتانول تخمیر می کنند. اسپیروکت ها دارای دو سیستم تجزیه پکتین (جابجایی حذفی و پکتین استرازی) می باشند، که آنها را در تجزیه سریع قدرتمند ساخته است. آنزیم لیاز این باکتری ها خارج سلولی محسوب می شود. تعداد حضور این باکتری ها در شکمبه محدود و عده ای از کارشناسان این گروه از باکتری ها را جزء جنس ترپونما طبقه بندی می کنند.

- **سوکسینوویبریو دکسترینوسولونس؛**

این گونه باکتریایی میله ای و تا حدی حلزونی شکل، با رنگ آمیزی گرم منفی، متحرک، دارای تاژک قطبی و با اندازه متغیر (طول ۱ تا ۵ نانومتر و عرض ۰/۳ تا ۰/۵ نانومتر) از شکمبه جداسازی شده است. دامنه حرارتی مورد نیاز این باکتری ۳۶ تا ۴۰ درجه سانتی گراد می باشد. این باکتری علاوه بر هضم پکتین قابلیت هیدرولیز نشاسته، و تخمیر گلوکز، گزیلوز، آرابینوز، گالاکتوز، له و لوز، ساکاروز، مانیتول، زایلان و دکسترین را دارا می باشد. مهمترین محصولات تخمیری این باکتری اسید استیک، فرمیک و سوکسینیک بوده و تولید گاز و الکل از موارد تخمیری ناچیز در آن محسوب می شود. همچنین این باکتری قدرت تولید ایندول یا استون را نداشته و بعضی از سویه های آن خاصیت تخمیر اوره از خود نشان می دهند. باکتری مزبور جهت رشد به آمونیاک و ویتامین K به شدت وابسته می باشد.

۵-۲-۳-۴ باکتری های تخمیر کننده قند

مواد قندی به دو صورت ساختاری و غیرساختاری در جیره نشخوارکنندگان مشاهده می شود. قندهای غیرساختاری و محلول به سرعت از شکمبه توسط گونه های تخمیر کننده قند و سایر باکتری ها محو و به اسیدهای چرب فرار تغییر می یابند. قندهای ساختاری (پلی ساکاریدها) هم توسط همین باکتری ها به تری، دی و مونو ساکارید تبدیل و در نهایت تخمیر می شوند. مهمترین محصولات تخمیری این گروه از باکتری ها پروپیونیک اسید، لاکتیک، فورمات، استات و دی یا مونو ساکاریدی هستند که از تخمیر فرار نموده اند. مهمترین باکتری های موجود در این دسته شامل گونه های لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*)، بورلیا (*Borrelia*)، گونه های بیفیدوباکتریوم (*Bifidobacterium*) سینتروفوکوکوس سوکروموتانس (*Syntrophococcus sucromutans*)، و ترپونما بریانتی (*Treponema Beryantii*) می باشد، که لاکتوباسیلی ها مهمترین آنها محسوب می گردد. سرعت تجزیه و تخمیر قندهای ساده توسط این گروه از باکتری ها سریع و قدرت عادت پذیری بالایی در نوسانات اسیدیته شکمبه دارند. این باکتری ها در اسیدیته شکمبه نقش اساسی بازی می کنند.

پلی ساکاریدهای خرد شده به مونو، دی و تری ساکارید می تواند توسط سایر باکتری ها مصرف و در درون اندامک های سلولی خود یک زنجیره پلی ساکاریدی ذخیره ایی را بوجود آورند. این ذخیره سازی گاه تا ۵۰ درصد وزن باکتری را شامل می گردد.

- **لاکتوباسیلوس های بی هوازی؛**

این باکتری ها میله ای شکل، گرم مثبت، غیر متحرک (گاهی متحرک)، با اندازه کاملا متغیر (طول ۲ تا ۶۰ نانومتر و عرض ۰/۵ تا ۰/۷ نانومتر) و غیر هاگ زا شناسایی شده اند. این باکتری ها دارای رشته های طولانی با عناصر گرم مثبت و منفی دیده می شوند. درباره تحرک لاکتوباسیلوس ها اطلاعات ضد و نقیضی وجود دارد. بطورمثال؛ گونه رومینوس (*L. ruminus*) متحرک و ویتولینوس (*L. vitulinus*) غیر متحرک می باشد. مهمترین گونه های شناخته شده لاکتوباسیلوس در شکمبه عبارتنداز کازئی (*L. casei*)، فرمنتی (*L. fermentii*)، پلانتاروم (*L. plantarum*)، بیفیدوس (*L. bifidus*)، لاکتیس (*L. lactis*)، برویس (*L. brevis*)، سالیواریوس (*L. salivarius*)، بوچنری (*L. buchneri*)، سلوبیوسوس (*L. cellobiosus*) و هیوتیکوس (*L. heiveticus*) می باشد. معروفترین گونه موجود در شکمبه لاکتوباسیلوس لاکتیس می باشد که با افزایش غلات جمعیت آنها افزایش می یابد. لاکتوباسیلوس ها قادر به هیدرولیز نشاسته نبوده و عمده محصولات تخمیری آنها اسید لاکتیک (نوع ال و دی)، پروپیونیک و مقادیر کمی گاز و الکل می باشد. این گروه از گونه های باکتریایی مانند رومینوس قادر به تخمیر سوکروز، میلبیوز، رافینوز، سالیسین و آمیگدالین هستند.

- **بورلیا؛**

این گونه باکتریایی از لحاظ شکلی تقریبا بی قاعده (*Pleomorphic*) و بیشتر حلزونی شکل در مخازن تخمیر یافت می شود. باکتری بورلیا حتی در تشکیل کلونی شباهت زیادی به اسپیروکت ها دارد و تنها عامل شاخص در تفاوت این دو باکتری نوع رنگ آمیزی لکه دار انیلین در بورولیا می باشد. این باکتری علاوه بر تخمیر قند قدرت هضم سلولز را نیز دارا بوده و در هنگام تخمیر قندها به مقدار فراوانی اسید سوکسینیک و استیک و به میزان کمتری اسید لاکتیک، فورمیک، اتانول و دی اکسیدکربن تولید می نماید. مهمترین سویه شناخته شده در این گونه باکتریایی بورلیا وینسنتی (*Borrelia vincentii*) می باشد.

- **سینتروفوکوکوس سوکروموتانس؛**

این باکتری در سال ۱۹۸۶ از شکمبه دام ها جداسازی شده است. از لحاظ ریخت شناسی این گونه باکتریایی کروی شکل، غیرمتحرک، گرم منفی، با اندازه متغیر به قطر ۱ تا ۱/۳ نانومتر و کاملا بی هوازی شناسایی شده است. مواد مغذی مورد استفاده این باکتری متنوع و عمدتا از به ترتیب از گلوکز،

فروکتوز، پیروات، گالاکتوز، سلوبیوز، لاکتوز، آرابینوز، مالتوز، رایبوز، زایلوز و سالیسین می باشد. حیاتی ترین ماده غذایی برای رشد این باکتری در شکمبه تری گلیسیریدها یا فسفولیپیدها ذکر شده است. تولیدات تخمیری این باکتری فورمات و استات می باشد. سیستم انتقال الکترون در این باکتری گسترده و توسط گروه های فورمات، کافئات، فرولات، وانیلین، وانیلات و ۳-۴-۵ تری متوکسی بنزوات انجام می گیرد.

- **گونه های بیفیدوباکتریوم؛**

این گونه های باکتریایی تا سال ۱۹۶۶ در ردیف لاکتوباسیلوس ها طبقه بندی می شد. این باکتری ها از لحاظ ریخت شناسی مشابه لاکتوباسیلوس ها بوده واز لحاظ توالی ژنتیکی با هم متفاوت هستند. بیفیدوباکتریاها به راحتی گلوکز را به اسیدهای چرب لاکتیک و استیک به نسبت ۳ به ۲ تخمیر می کنند. مهمترین گونه های باکتریایی جدا شده از شکمبه در این گروه شامل گلوبوسوم (*B. globosum*)، لانگوم (*B. longum*)، آدولسکنتیس (*B. adolescentis*)، ترموفیلوم (*B. thermophilum*)، بوم (*B. boum*)، رومینال (*B. ruminale*)، مری سیکوم (*B. merycicum*) و رومینانتیوم (*B. ruminantium*) می باشد. این گروه از باکتری ها با افزایش نشاسته جیره غذایی به طور معنی داری افزایش می یابند و در دام های جوان بیشتر از دام های مسن تر دیده می شوند. ۷۰ درصد این گروه باکتریایی را گونه رومینال تشکیل می دهد. محصولات تخمیری این باکتری ها همانند گونه های لاکتوباسیلوسی می باشد.

۶-۲-۳-۴ باکتری های تخمیر کننده اسید

گروهی از باکتری ها هستند که برای به تعادل رساندن محیط تخمیری شکمبه از اسیدهای آلی تولید شده در مسیرهای تخمیری سایر باکتری ها استفاده نموده و آنها را از محیط شکمبه محو می نمایند. از آنجا که اسیدهای چرب فرار استیک، پروپیونیک و بوتیریک به سرعت جذب میزبان می گردد، کمتر مورد بهره برداری میکروبی خواهد شد. اما به دلیل تاثیرات منفی تر اسیدهای چرب لاکتات و سوکسینات و همچنین فورمات، باکتری ها مبادرت به مصرف سریع آنها نموده تا محیط را برای ادامه زندگی آماده سازنند. بطور مثال؛ تخمیر اسید لاکتیک بوسیله باکتری های تخمیر کننده اسیدهای آلی منجر به تولید اسید استیک، پروپیونیک و سایر اسیدهای بلند زنجیره می گردد. و یا سوکسینات که یکی از محصولات عمده تخمیر اکثر باکتری های شکمبه محسوب می شود، برای تولید اسید پروپیونیک و دی اکسیدکربن جهت احیای هیدروژن اضافی مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین، فورمات بوسیله باکتری های تخمیر کننده اسید به عنوان پیش ماده متان مورد مصرف واقع می شود. مهمترین باکتری های اختصاصی جداسازی شده از شکمبه مگاسفرا السدنی (*Megasphaera elsdenii*)، پروپیونی

باکتریوم (*Propionibacterium*)، اروکسیک باکتریوم (*Euryoxic bacterium*)، فوزوباکتریاها (*Fusobacteria*)، و ویلونلا آلکالسنس (*Veillonella alcalescens*) می باشد. از طرف دیگر باکتری های همپوشان در تخمیر اسیدهای آلی تولید شده در شکمبه ویبریوسوکسینوژنز (*Vibrio succinogenes*)، آنایرو ویبریو لیپولیتیکا (*Anaerovibrio lipolytica*)، گونه های سلنوموناس (*Selenomonas spp*)، پپتواسترپتوکوکوس السدنی (*Peptostreptococcus elsdenii*) و متانوبروی باکتر رومینانتیوم (*Methanobrevibacter ruminantium*) شناسایی شده است.

- **مگاسفرا السدنی؛**

نام دیگر این گونه باکتریایی پپتواسترپتوکوکوس السدنی می باشد، که در در دهه ۵۰ میلادی از شکمبه جداسازی شده است. این گونه باکتریایی غیر متحرک، کروی شکل، با رنگ آمیزی گرم منفی که بیشتر اوقات به صورت یک زنجیره (حداکثر تا ۲۰ سلول) در شکمبه دیده می شوند. اندازه این باکتری متغیر و قطر آن بین ۱/۵ تا ۲/۶ نانومتر متغیر می باشد. این باکتری همانند سایر باکتری های تخمیر کننده اسید با مصرف سیلو به شدت در شکمبه افزایش می یابند. از طرف دیگر مصرف علوفه به دلیل افزایش اسید استیک به صورت معنی داری بر تعداد این باکتری ها موثر و مهمترین وظیفه آنها در شکمبه حذف دی – ال - لاکتات تولیدی یا اضافی ناشی از مصرف بالای غلات از محیط شکمبه می باشد. این باکتری قادر به تخمیر گلوکز، فروکتوز، مالتوز، آزادسازی آمونیاک و هیدرولیز پروتئین و گلیسرول بوده و محصولات عمده آنها در تخمیر مواد غذایی استیک، پروپیونیک، بوتیریک، والریک و گاز دی اکسیدکربن است. لاکتات مصرفی عمدتا به اسید بوتیریک و پروپیونیک تخمیر شده و مقداری الکل هم در تخمیر این باکتری بر روی مواد مغذی دیده می شود. این باکتری در تولید اسیدهای چرب شاخه دار نقش زیادی ایفا می کند.

- **ویلونلا آلکالسنس؛**

این باکتری در سال ۱۹۵۱ از شکمبه استخراج و مورد مطالعه قرار گرفت. ویلونلا یک باکتری کروی شکل با قطر متغیر ۰/۳ تا ۰/۶ نانومتر، گرم منفی و غیر متحرک می باشد. درجه حرارت مطلوب این باکتری ۳۷ درجه سانتی گراد بوده و در اسیدیته ۶ تا ۸ بهترین کارآیی را از خود نشان می دهد. کارشناسان به طور تقریبی جمعیت این باکتری را در گوسفند $۷/۴ \times ۱۰^{۶}$ در هر میلی لیتر مایع شکمبه و ۲۰۰۰ در هر ملی لیتر مایع شکمبه گاو تخمین می زنند. این باکتری قادر به تخمیر قندها نمی باشد و برای فعالیت خود به بیوتین و ویتامین کوبال آمین (B_{12}) به شده وابسته می باشد. این باکتری مصرف کننده اصلی اسید لاکتیک بوده و آن را به اسید استیک، پروپیونیک، سولفید هیدروژن و دی اکسید کربن تبدیل می کند. همچنین ویلونلا اسید سوکسینیک را دکربوکسیله کرده و اسید پروپیونیک و گاز

کربنیک تولید می کند. همچنین آزمایشات نشان می دهد که این گونه باکتریایی در زمان مصرف علوفه های سردسیر و زمستانی بیشتر توسعه می یابند.

- **فزوباکتریا؛**

این گروه از باکتری ها گرم منفی، میله ای نوک تیز و غیر متحرک می باشند، که در دهه ۵۰ میلادی از شکمبه جداسازی شده اند. این باکتری ها از مصرف کننده های اسید لاکتیک محسوب می شوند و از هفته های اول در دستگاه گوارش دام های جوان مشاهده می گردند. این باکتری قابلیت مایع سازی ژلاتین را داشته و نشاسته را نیز هیدرولیز می نماید. فزوباکتریاها قدرت تخمیر تره هالوز و مانیتول را داشته و تولید کننده ایندول هم می باشند. دامنه حرارتی مطلوب این باکتری وسیع و از ۲۲ درجه سانتی گراد تا ۴۵ درجه سانتی گراد امتداد یافته است. گونه فوزوباکتریا فوزیفورم (*Fusobacterium fusiforme*) از مهمترین گونه های این باکتری در مصرف اسید لاکتیک می باشد. گونه های این باکتری می تواند براساس تولید آمونیاک و هیدروژن متفاوت باشند. بطور مثال؛ گونه فوزوباکتریوم بیاکوتوس (*Fusobacterium biacutus*) قابلیت تولید گاز هیدروژن را دارا می باشد.

- **پروپیونی باکتریوم؛**

یکی دیگر از گونه های استفاده کننده اسیدهای آلی در شکمبه به خصوص اسید لاکتیک باکتری پروپیونی باکتریوم می باشد. از آنجا که این باکتری در مواد غذایی هم یافت می شود، عده ایی از محققین بر این باور شدند که میکروب مزبور یک باکتری عبوری و غیر ثابت در شکمبه می باشد. فعالیت این باکتری ضعیف تر از باکتری ویلونلا است. اما، پروپیونی باکتریوم تمامی روندهای باکتری ویلونلا را در سرعت پایین تری انجام می دهد.

۷-۲-۳-۴ باکتری های تولید کننده متان

این گروه از باکتری ها نقش مهمی در اکوسیستم شکمبه بازی می کنند. یکی از جنجال برانگیزترین باکتری های شکمبه گروه متان زا ها می باشد. در طی دستکاری های شکمبه محققین خواهان کاهش فعالیت آنها به دلیل ازدیاد گازهای گلخانه ایی در اتمسفر زمین و افزایش کارآیی انرژی در شکمبه هستند. این باکتری ها هیدروژن اضافی شکمبه را که سبب کاهش فعالیت های تخمیری در شکمبه می شود، را با تغییرات شیمیایی و با کمک دی اکسیدکربن به متان تبدیل و آن را از محیط شکمبه خارج می کنند. هیدروژن با مصرف علوفه و فعالیت باکتری ها افزایش یافته و سبب کاهش رشد میکروارگانیسم ها در تخمیرهای بعدی می گردند. باکتری های متان زا در شکمبه دام های سنگین مانند گاوان با مبنای علوفه مصرفی، به طور تقریبی روزانه تا ۶۰۰ لیتر گاز متان تولید نمایند. جمعیت این دسته

از باکتری ها متغیر و بین 1×10^{6} تا 2×10^{8} براساس نوع خوراک مصرفی در حال نوسان می باشد. مهمترین باکتری های این گروه شامل متانوباکتریوم رومینانتیوم (*Methanobactrium ruminantium*)، متانوباکتریوم فورمیسیکوم (*Methanobacterium formicicum*)، متانومیکروبیوم موبایل (*Methanomicrobium mobile*)، متانوباکتریوم ساب اکسیدنس (*Methanobactrium suboxydans*)، متانوباکتریوم سوهنجنی (*Methanobacterium sohngenii*)، متانوباکتریوم پروپیونیکوم (*Methanobactrium propionicum*)، متانوبروی باکتر اسمیتی (*Methanobrevibacter smithii*) و متانوسارسینا بارکری (*Methanosarcina barkeri*) می باشد.

- **متانوباکتریوم رومینانتیوم؛**

نام جدید این باکتری متانوبروی باکتر رومینانتیوم (*Methanobrevibacter ruminantium*) می باشد، که در دهه ۵۰ میلادی از شکمبه جداسازی شد. این گونه باکتریایی میله ای شکل کوتاه، غیرمتحرک، کپسول دار، رنگ آمیزی گرم مثبت، غیر هاگ زا و با اندازه متغیر ۰/۸ تا ۱/۸ نانومتر طول و ۰/۷ تا ۱ نانومتر عرض دیده می شود. دامنه درجه حرارت مناسب برای رشد این باکتری بین ۳۶ تا ۴۱ درجه سانتی گراد و اسیدیته مطلوب آنها ۶/۶ تا ۸ می باشد. پتانسیل اکسید و احیای مورد نیاز این باکتری ها ۳۵۹- میلی ولت است. وجود ۸۰ درصد هیدروژن و ۲۰ درصد گاز کربنیک در محیط گازی رشد این باکتری ها را دو چندان می نماید. منبع انرژی این باکتری از هیدروژن، دی اکسیدکربن و فورمات تامین و منبع نیتروژنی آنها یون آمونیوم محسوب می شود. کربن مورد نیاز این باکتری ها از استات و بوتیرات بدست می آید. مواد اولیه مصرفی توسط این باکتری به آب، متان و گازکربنیک تخمیر می شود.

- **متانوباکتریوم فورمیسیکوم؛**

این گونه باکتریایی میله ای شکل، متحرک، با رنگ آمیزی گرم منفی و گاه مثبت، دارای تاژک و با اندازه متغیر (بین ۱ تا ۵ نانومتر طول و ۰/۴ تا ۱ نانومتر عرض) تعیین شده است. درجه حرارت مطلوب این باکتری ها بین ۳۷ تا ۴۴ درجه سانتی گراد ارزیابی و اسیدیته قابل تحمل این باکتری ۶/۵ تا ۸ متغیر است. فورمیسیکوم نسبت به حضور اکسیژن حساس بوده و تنها از کربن موجود در فورمات برای تولید متان بهره می جوید. هیدروژن و دی اکسیدکربن لرای تولید متان ماده اصلی محسوب می شوند. این باکتری علاوه بر تولید متان اقدام به تولید دی اکسیدکربن و کربنات سدیم می نماید. ۸۰ درصد هیدروژن و ۲۰ درصد دی اکسیدکربن فضای مطلوبی را برای فعالیت تخمیری این باکتری فراهم می کند. البته گونه مزبور همانند باکتری متانوسارسینا باکری اهمیت کمتری در تولید متان دارد.

• **متانومیکروبیوم موبایل؛**

گونه باکتریایی موبایل در سال ۱۹۶۸ از شکمبه جداسازی و تعیین هویت شد. این باکتری گرم منفی، کم تحرک، غیر هاگ زا، میله ای شکل کوتاه با ابعاد طول ۱/۶ تا ۲/۱ نانومتر و عرض ۰/۵ تا ۰/۷ نانومتر، حساس به اکسیژن و به شرایط اسیدی کاملا حساس می باشد. پذیرش هیدروژن توسط این باکتری در اسیدیته بالای ۶ کاهش می یابد. درجه حرات مناسب این باکتری ۴۰ درجه سانتی گراد و اسیدیته مطلوب مورد نیاز آن ۶/۱ تا ۷ می باشد. برای تولید متان این باکتری تنها از فورمات، هیدروژن و گاز کربنیک استفاده می نماید. غلظت این باکتری در شکمبه زیاد است.

• **متانوباکتریوم ساب اکسیدانس؛**

تعداد این باکتری ها در شکمبه کم و رشد آنها محدود می باشد. این گونه باکتریایی میله ای کوتاه، کم تحرک و گرم مثبت مشاهده می شوند. این باکتری با اکسید کردن بوتیرات به استات و احیای گاز کربنیک، گاز متان تولید می کنند. باکتری ساب اکسیدانس با اکسیداسیون ناقص اسید والریک و کاپروئیک اقدام به تولید متان، اسید استیک و پروپیونیک می نماید.

• **متانوباکتریوم پروپیونیکوم؛**

حضور این باکتری ها در شکمبه محدود و به صورت میله ای شکل، کم تحرک و اسپوردار در شکمبه شناسایی شده اند. این باکتری می تواند استات را از طریق اکسیداسیون پروپیونات تولید و در کنار این روند اقدام به تولید متان و گازکربنیک می کند.

• **متانوسارسینا باکری؛**

این گونه باکتریایی کروی شکل و بی قاعده، قطری به اندازه ۲ تا ۳ نانومتر، غیر متحرک و با رنگ آمیزی گرم مثبت در شکمبه مشاهده می شوند. متان تشکیل شده در این باکتری از هیدروژن، دی اکسیدکربن، استات، متیل آمین ها، سولفید، آمونیاک و متانول حاصل می شود.

۸-۲-۳-۴ باکتری های تجزیه کننده پروتئین

تقریبا اکثر باکتری هایی که در شکمبه زیست می کنند، تجزیه کننده قند می باشند. باکتری ها انرژی خود را از تخمیر قندها به دست می آورند. دسته ایی از باکتری ها که بین ۲۰ تا ۴۰ درصد جمعیت باکتریایی شکمبه را شامل می شوند، قسمت زیادی (۶۰ تا ۹۰ درصد) از مواد پروتئین خوراکی را تجزیه و به عناصر سازنده آن تبدیل می نمایند. سایر باکتری ها استعداد اندکی جهت تجزیه پروتئین داشته و از محصولات باکتری های تجزیه کننده پروتئین استفاده می کنند. پروتئین توسط اگزوپپتیدازهای این دسته از باکتری ها تجزیه و به پپتیدهای ساده تر و عناصر آن تجزیه می شوند.

همچنین پروتئیناز از آنزیم های اصلی این باکتری ها در تجزیه زنجیره پروتئینی محسوب می شود. در طی تجزیه پروتئین به اسیدهای آمینه هیچ انرژی (ATP) تولید نمی شود و انرژی باید از منابع دیگر مانند کربوهیدرات ها تامین گردد. مهمترین باکتری های تجزیه کننده پروتئین از نوع گرم منفی شامل بعضی از سویه های سلنوموناس رومینانتیوم (*Selenomonas ruminantium*)، باکتریوئیدس آمیلوفیلوس (*Bacteroides amylophilus*)، باکتریوئیدس رومینوکولا (*Bacteroides ruminicola*) و سوکسینوویبریو (*Succinivibrio spp*) و از نوع گرم مثبت باکتریوئیدس فیبروسولونس (*Bacteroides fibrisolvens*)، گونه پروپیونی باکتریوم (*Propionibacterium spp*)، گونه های گونه های کلستریدیوم (*Clostridium spp*)، گونه های ائوباکتریوم (*Eubacterium spp*)، گونه های لاچنوسپیرا (*Lachnospira spp*) و استرپتوکوکوس بوویس (*Streptococcus bovis*) می باشد.

- **گونه های سوکسینوویبریو؛**

این باکتری ها میله ای شکل، در رنگ آمیزی گرم منفی، متحرک و با اندازه ۱/۵ نانومتر طول و ۰/۵ نانومتر عرض شناسایی شده اند. این باکتری منبع انرژی خود را از گلوکز تامین می کنند. بسیاری از سویه های این گونه باکتریایی دارای فعالیت پروتئولایتیکی (تجزیه کننده پروتئین) می باشند.

۴-۳-۲-۹ باکتری های تولید کننده آمونیاک و اوره

آمونیاک از اصلی ترین مواد مغذی مورد مصرف میکروارگانیسم ها محسوب می گردد که توسط جمعیت محدودی از باکتری ها به صورت گسترده تولید می شود. میزان غلظت این ماده غذایی به حلالیت پروتئین یا موادی که حاوی نیتروژن هستند (مانند اوره)، دارد. لازم به یاد آوری است که سرعت دی آمیناسیون از پروتئولیز همواره کمتر بوده است. اما به دلیل گسترده بودن جمعیت باکتریایی مشغول به این کار غلظت آمونیاک به سرعت پس از مصرف ترکیبات پروتئینی و غیر پروتئینی افزایش می یابد. شاخص ترین باکتری های شناخته شده در تولید آمونیاک باکتریوئیدس رومینوکولا (*Bacteroides ruminicola*)، تعدادی از سویه های سلنوموناس رومینانتیوم (*Selenomonas ruminantium*) و مگاسفرا السدنی (*Megasphaera elsdenii*) می باشد. اما باکتری های هضم کننده اوره که سبب سنتز آمونیاک یا سایر مواد نیتروژنی می شود را به ترتیب اهمیت رومینوکوکوس برومی (*Ruminococcus bromii*)، باکتریوئیدس رومینوکولا (*Bacteroides ruminicola*)، گونه های بوتیریوویبریو (*Butyrvibrio spp*)، گونه های سلنوموناس (*Selenomonas spp*)، سوکسینی ویبریو دکسترینوسولونس (*Succinivibrio dextrinosolvens*) و گونه های ترپونما (*Treponema spp*) می نامند.

- **رومینوکوکوس برومی؛**

این گونه باکتریایی کروی شکل (زنجیره ای کوتاه و تک سلولی)، با رنگ آمیزی گرم مثبت و غیرمتحرک از شکمبه دام ها جداسازی شده است. گونه برومی بسیار شبیه به گونه رومینوکوکوس آلبوس بوده و تنها براساس منبع انرژی مورد استفاده برای رشد و تمایل باکتری جهت تخمیر ماده اولیه از یکدیگر متمایز شده اند. این باکتری برعکس گونه آلبوس دارای غشای گلایکوکالیکس خوبی می باشد. رومینوکوکوس برومی علاوه بر هضم اوره، تخمیر کننده خوب نشاسته محسوب می گردد. سایر مواد مغذی مورد استفاده این باکتری مالتوز، سلولز و فروکتوز می باشد. محصولات عمده این باکتری ناشی از تخمیر قندها همانند گونه آلبوس قلمداد می شود.

۱۰-۲-۳-۴ باکتری های تجزیه کننده چربی

این گروه از باکتری ها چربی غذایی را به اسیدهای چرب آزاد اشباع شده و گلیسرول آزاد تبدیل می کنند. اگر چه جمعیت این دسته از باکتری ها کمتر از باکتری های تجزیه کننده قند و پروتئین هستند، اما می توانند با صرف هیدروژن اضافی و اشباع سازی اسیدهای چرب غیر اشباع محیط را برای سایر میکروب ها آماده نمایند. آنزیم های تجزیه کننده چربی به صورت لیپاز خارج سلولی و متصل به غشای خارجی باکتری ها مشغول به فعالیت می باشند. باکتری ها در این گروه اقدام به هیدروژناسیون و ایزومریزاسیون اسیدهای چرب می پردازند. مهمترین باکتری اختصاصی این گروه گونه آنایرووبیبریولیپولیتیکا (*Anaerovibrio lipolytica*) و گونه میکروکوکوس (*Micrococcus spp*) عنوان شده است. سایر باکتری هایی که به صورت همپوشان اقدام به تجزیه چربی می کنند شامل گونه های یوباکتریوم (*Eubacterium spp*)، ویلونلا آلکالسنس (*Veillonella alcalescens*)، ترپونما بریانتی (*Treponema Beryantii*) و بوتیرویبریو فیبروسولونس(*Butyrvibrio fibrisolvens*) می باشد.

لازم به توضیح است که باکتری های شکمبه به صورت متفاوت در برابر حضور چربی ها و اسیدهای چرب به خصوص نوع بلند زنجیره آن واکنش از خود نشان می دهند. بطور مثال؛ باکتری های گرم منفی رومینوکوکوس فلاووفاسینس و رومینوکوکوس آلبوس در برابر اسیدهای چرب بلند زنجیره بسیار آسیب پذیر بوده و در حالی که گروه رومینوکولا و سلنوموناس رومینانتیوم را تحریک جهت فعالیت های متابولیسمی می کند. و یا باکتری های متان زا در برابر چربی های غیر اشباع در برابر اسیدهای چرب اشباع ضعیف تر و آسیب پذیر ترند. علت آسیب پذیری آنها مربوط به رقابت آنها برای گرفتن هیدروژن جهت تولید متان می باشد. اما اسیدهای چرب غیراشباع با فرم سیس اثرات مخرب تری بر باکتری های متان زا در برابر اسیدهای چرب با فرم ترانس از خود نشان می دهند. اما در مجموع

باکتری های گرم منفی در مقابل گرم مثبت تحمل بیشتی در برابر حضور چربی ها دارند. علت این مسئله مربوط به دیواره سلولی آنها و حضور لایه لیپوپلی ساکاریدی و لیپوپروتئین می باشد. این دو لایه همانند سد فیزیکی ممانعت از ورود اسیدهای چرب به سیتوپلاسم سلول باکتریایی می کنند. البته اثر ضد باکتریایی چربی به ویژگی های فیزیکی-شیمیایی خوراک مصرفی وابسته می باشد.

- **آنایروویبریولیپولیتیکا؛**

این گونه باکتریایی میله ای شکل، گرم منفی، متحرک، دارای تاژک های قطبی و با اندازه متغیر (طول ۱/۲ تا ۳/۶ نانومتر و عرض ۰/۳ تا ۰/۵) شناسایی شده است. جمعیت این باکتری در شکمبه در حد مناسب و تا $۱۰^{۷}$ در هر میلی لیتر مایع شکمبه دیده می شود. این باکتری تخمیر کننده چربی به خصوص گلیسرول، چربی های گیاهی مانند لانولین و موم ها، تری گلیسریدها، قند فروکتوز و بعضی اسیدهای آمینه می باشد. محصولات تخمیری ناشی از فعالیت این باکتری اسیدهای چرب آزاد اشباع شده و در حد فراوان اسیدهای چرب فرار پروپیونیک، سوکسینیک و در حد کمتر هیدروژن، دی اکسیدکربن، اسید لاکتیک و استیک می باشد. برای رشد این باکتری ها در شکمبه وجود اسیدهای آمینه، ویتامین های اسید فولیک، پانتوتنیک اسید و پیرودوکسال فسفات حیاتی می باشند.

- **گونه های میکروکوکوس؛**

میکروکوکوس ها باکتری های کروی شکل با قطر متغیر ۰/۵ تا ۱ نانومتر در شکمبه و مخازن تخمیری مشاهده می شوند. تعدادی زیادی از باکتری ها در این ردیف جای گرفته و در واکنش های رنگ آمیزی خاصیت گرم مثبت از خود نشان می دهند. دامنه فعالیتی این باکتری ها در دمای شکمبه محدود و بهترین دمای مورد نیاز آنها ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد. این باکتری ها علاوه بر تخمیر چربی ها اقدام به تخمیر قندها و تجزیه پروتئین پرداخته و محصولات متنوعی از تخمیر مانند اسیدهای چرب آزاد اشباع شده، اسیدهای آمینه و آمونیاک، اسیدهای فرمیک، لاکتیک و بوتیریک تولید می کنند.

۴-۴ فعالیت های حیاتی در باکتری ها

میکروارگانیسم های شکمبه در حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد ماده خشک قابل هضم جیره را تجزیه می کنند. از آنجا که این مواد تجزیه شده سبب پویایی دام ها در طبیعت می شوند، لذا حفظ و نگهداری میکروب ها به خصوص باکتری ها در تداوم این پویایی حیاتی و مطالعه درباره رفتارهای آنها در شکمبه امری اجتناب ناپذیر تلقی می گردد. اگر چه فعالیت های حیاتی یک موجود پر سلولی بصورت تخصصی توسط بافت ها کنترل می شود، اما مبانی همه موجودات (تک سلولی یا پرسلولی) بر چهار

محور کلی رشد، تکثیر، تبادلات و ایمنی انجام می گیرد. یک ارگانیسم تک یاخته مجبور است تمامی فرآیندهای مذکور را خود انجام دهد. برای اینکه بتوان تداوم یک باکتری در شکمبه را تضمین و یا شرایط حضور آنها را در مخزن تخمیر بواسط دستکاری بوجود آورد، لازم است فرآیندهای حیاتی را برای فعالیت های سودمند مورد نظر کنترل و مطلوب نمود.

۴-۴-۱ رشد

برخلاف مباحث پیشین رشد که بیشتر جنبه بیرونی (تراکم جمعیت) داشت، در این مبحث، رشد یک یاخته میکروبی و جنبه درونی (اندازه و اندامک های سلولی موجود در سلول) آن مدنظر است. تعریف رشد بر اساس جنبه درون سلولی شامل مجموع تغییراتی است که یک یاخته میکروبی از لحظه تولد تا تکثیر یاخته جدید در پی می گیرد. مجموع این تغییرات یکی از مراحل ۵ گانه ایست که در مباحث قبلی به عنوان مرحله تاخیری نامگذاری شده است. در این نوع از مبانی رشد باکتری ها می توانند خصوصیات متفاوتی در طی گذشت سن خود بروز دهند. بطور مثال؛ تغییر نوع رنگ آمیزی گرم در باکتری های رومینوکوکوس فلاوفاسینس، رومینوکوکوس آلبوس، بوتیرویبریوفیبروسولونس، سیلوباکتریوم سلولوسولونس و لاچنوسپیرا مولتی پاروس از حالت گرم مثبت در یاخته های جوان به گرم منفی در یاخته های پیر (بالغ تر) و یا تغییر شکل ظاهری در باکتری های پروتلا رومینوکلا، فیبروباکترسوکسیوژنز و استرپتوکوکوس بوویس از حالت میله ای در یاخته جوانتر به کروی یا متورم شده در یاخته های پیر می توان اشاره نمود. در نهایت رشد یک یاخته میکروبی می تواند با رشد والد خود به دلیل جهش های متوالی ناشی از مصرف ریز مغذی ها مانند آنتی بیوتیک و یا تغییر شرایط محیطی جدید متفاوت گردد. بطور مثال؛ تفاوت هضم مواد مغذی در دو سویه از یک گونه باکتریایی براساس تحمیل شرایط محیطی جدید از این دسته موارد می باشد. این تغییرات و سهولت آن تنها به رشد باکتری مربوط نمی شود. سهولت ازدیاد باکتری ها به دلیل نوع تولیدمثل و کم بودن فاصله نسل های بین آنها در این زمینه نقش اساسی بازی می کند.

مهمترین فاکتور قابل بررسی در این بخش کنترل رشد باکتری (بزرگتر شدن یاخته باکتری) است. این سئوال همواره مطرح می باشد که چه عاملی سبب توقف رشد یاخته و ثابت ماندن اندازه باکتری می شود؟ کارشناسان معتقدند نسبت بین فضای درونی و سطح غشای یاخته، علت اصلی محدودیت رشد باکتری است. برای ادامه حیات، یاخته باید بین مواد ورودی و خروجی توازن برقرار کند. می دانیم بین ورود و خروج مواد و سطح غشای یاخته رابطه مستقیمی وجود دارد. هر چه اندازه یاخته بیشتر باشد نسبت حجم به غشا بیشتر می شود و یاخته به غشای بزرگتری نیاز دارد. در نتیجه یاخته نمی‌تواند مواد

مورد نیاز را وارد یاخته و همچنین نمی‌تواند مواد زائد و سمی یاخته را دفع نماید. لذا یاخته چاره ای جز کنترل اندازه خود ندارد. از طرف دیگر، وقتی یاخته بزرگتر می‌شود نسبت وزن یاخته به سطح غشای آن نیز افزایش می‌یابد. در نتیجه هر چه یاخته کوچکتر باشد شانس بقای بیشتری هم خواهد داشت. به همین دلیل است که یاخته های باکتریایی کروی یا مدور به نظر می رسند. یاخته های کروی دارای حداکثر مساحت سطح غشاء نسبت به حجم و دارای استحکام سلولی بالاتری در مقایسه با سایرین دارد. بعضی تک یاخته ای ها میله‌ای شکل می باشند. هر چند شکل میله‌ای در مقایسه با شکل کروی دارای مساحت بیشتری است، اما شکل میله‌ای دارای استحکام کمتری نسبت به شکل کروی می باشد.

۲-۴-۴ تکثیر

هر موجودی جهت دوام نسل خود و ایجاد شرایط مساعد فعالیتی اقدام به تولیدمثل می نماید. درباره تولید مثل باکتری ها دو دیدگاه متفاوت دیده می شود. دیدگاه اول وابسته به اندازه باکتری ها است. باکتری ها وقتی از لحاظ توازن ورود و خروج مواد غذایی دچار مشکل شوند، اقدام به تکثیر سلولی می نمایند. تقسیم سلولی و قطعه قطعه شدن براساس دیدگاه اول کاملا قابل توجیه می باشد. اما در دیدگاه نوع دوم تکثیر یک عملی جهت توسعه جمعیت همخوان و رفع خطرات احتمالی است. جوانه زنی و آمیختگی دیدگاه نوع دوم را توجیه می کند. در هر صورتی، بیشترین نوع تکثیر در باکتری های شکمبه براساس تقسیم مستقیم سلولی صورت می گیرد. در این شیوه از تولیدمثل غیر جنسی، دو نیم شدن یکی از خصوصیات بارز باکتری هاست. در این حالت باکتری ها در محیط مناسب، مواد مورد نیاز را جذب و قسمتی از آن را به پروتوپلاسم تبدیل نموده و در نتیجه بر حجم باکتری افزوده می‌شود. وقتی رشد باکتری به حد مشخصی رسید، پروتوپلاسم آن بر اثر پیدایش دیواره‌ای عرضی در قسمت میانی به دو قسمت تقسیم شده و یک باکتری به دو باکتری تبدیل می‌گردد. در تقسیم مستقیم، باکتری به صورت تصاعد هندسی افزایش می یابد. بدین معنی که یاخته ابتدا به ۲ و سپس به ۴ و ۸ و ... تقسیم می‌شود. بنابراین هر نسل دو برابر تعداد یاخته‌های نسل پیشین را دارا است. به هنگام رشد فعال نرخ افزایش جمعیت میکروبی به صورت تابع نمایی بررسی می گردد. شماره باکتری ها در هر مقطعی از زمان بسته به تعداد اولیه جمعیت و شمارش نسل های بوجود آمده دارد و این رابطه با معادله ۱-۴ نمایش داده می شود:

معادله ۱-۴:

$$B_f = B_i \times 2^n$$

B_f = شمارش نهایی باکتری ها

B_i = تعداد اولیه باکتری ها

n = شماره تعداد نسل ها

طول زمانی که تعداد جمعیت باکتری ها دو برابر می‌شود را زمان مضاعف شدن می گویند. تعیین زمان مضاعف با استفاده از معادله ۲-۴ امکان پذیر است:

معادله ۲-۴: $G = t / 3.3 \log 2 \times (b / B)$

G = زمان مضاعف شدن

t = طول زمانی که شماره یاخته از نقط B مرحله لگاریتمی به نقط b می رسد

b = جمعیت پس از زمان log2t بر مبنای log10 محاسبه می شود

B = جمعیت اولیه باکتری ها

فاکتور ۳/۳ در معادله ۲-۴ عامل تبدیل log2 به log10 می باشد. زمان مضاعف شدن معمولا تحت شرایط ثابت فیزیکی و شیمیایی برای هر ارگانیسم ثابت است. بطور نظری میکروارگانیسم ها با زمان مضاعف شدن برابر ۳۰ دقیقه، طی ۲۴ ساعت می‌توانند ۲۴۸ یاخته بوجود آورند.

عوامل فراوانی در تکثیر باکتری ها موثر است که به طور کلی شامل فاکتورهای مرتبط با باکتری (وضعیت پوشش باکتری، سن و رقابت های میکروارگانیسمی)، مواد غذایی مورد دسترس (فراوانی مواد غذایی، از هم گسیختگی و میزان خرد شدگی مواد غذایی و وجود تعادل در مواد مورد نیاز)، محیط مخزن تخمیر (دما؛ اسیدیته، حضور کاتیون و آنیون ها، چگالی و ظرفیت نگهداری آب) و ترن آورن مواد تخمیری مخزن تخمیر (اسیدهای چرب تولیدی و گازهای تخمیری) می باشد. با وجود این فاکتورها باز جهت پایداری یک میکروارگانیسم مانند باکتری در مخزن تخمیر لازم است زمان تکثیر معادل یا کمتر از ۶۹ درصد زمان تجدید مایع شکمبه باشد. فرض نماییم باکتری با مایع شکمبه عبور کند و هر ۱۲ ساعت یک بار تجدید گردد. بنابراین لازم است باکتری دارای زمان تکثیر ۸ ساعت و یا کمتر باشد، تا در سیستم تخمیر شکمبه باقی بماند.

۳-۴-۴ تبادل

باکتری ها همانند سایر موجودات نیازمند مصرف موادمغذی و دفع سموم خود می باشند. جهت رسیدن به این هدف یعنی انتقال عناصر غذایی، مواد دفعی و آنزیم های هاضم آنها از محیط بیرونی به محیط درونی و یا بالعکس باکتری روش های متداولی را پیش می گیرد. باکتری ها می توانند بواسط فعالیت های انتشار (غیر فعال و تسهیل شده)، تغییر مکان ریشه ها و انتقال (فعال اولیه و ثانویه) از طریق غشای پلاسمایی مواد مورد نیاز خود را دریافت نمایند. انتشار غیر فعال از تفاوت غلظت در دو طرف غشای سیتوپلاسمی حاصل می گردد. آمونیاک و استات بواسط این روش به سادگی جذب باکتری می شود. سرعت انتشار به غلظت ماده مغذی وابسته است. انتشار تسهیل شده به واسط یک ماده ناقل که عموما پروتئینی می باشد، انجام می گیرد. عبور ماده مغذی در این روش هم به غلظت ان در دو طرف

غشاء وابسته می باشد. برخی از اسیدهای آمینه و تعدادی از قندها بر این روش جذب باکتری می شوند. انتقال فعال اولیه که با صرف انرژی حاصل از ATP همراه است، برای نفوذ یک ماده به داخل سلول خارج از شیب غلظتی فعالیت می کند. یون آمونیوم و بعضی از اسیدهای آمینه بر این روش وارد باکتری می شوند. این حالت سبب می گردد که حیاتی ترین موادمغذی مورد نیاز، حتی برخلاف شیب غلظتی جذب باکتری شوند. انتقال فعال ثانویه موجب نفوذ مواد مغذی به سلول باکتری می شود و باعث اختلاف بار الکتریکی آن می گردد. بار پروتون و یا کاتیون ها به خارج سلول هدایت و داخل سلول را دارای بار منفی اضافه می کند. این انتقال به انرژی ATP وابسته بوده و پروتونی که از سلول خارج می شود بوسیله اختلاف پتانسیل و اسیدیته به داخل سلول باز می گردد. برخی از مواد مانند اسیدهای آمینه از این شیوه در انتقال استفاده می کنند.

آخرین روش در تبادلات باکتریای تغییر مکان ریشه ها می باشد. سیستم تغییر مکان ریشه های جفت انتقال یک ماده با تغییر شیمیایی آن در زمان انتقال بوسیله یک آنزیم (فسفوریلاسیون) انجام می گیرد. در این واکنش یک گروه فسفات با یک پروتئین منتقل می گردد و سپس پروتئین گروه فسفات را به حالت نقال تغییر می دهد. انتقال بعضی از قندها مانند گلوکز، سلوبیوز و مالتوز از این روش تبعیت می کنند.

۴-۴-۴ ایمنی

باکتری ها زمانی که در حالت رشد، تبادل و تکثیر هستند، به آنها در حالت رویشی اطلاق می گردد. در این وضعیت باکتری به تغییرات ناگهانی دما، رطوبت، مواد شیمیایی و اسیدیته حساس و سریع از بین می رود. باکتری ها برای مبارزه در برابر شرایط نامطلوب و افزایش ایمنیت خود به مرحله ایی به نام هاگ زایی یا اسپور سازی (*Sporolation*) وارد می شوند. البته فقط برخی از باکتری ها مانند گروه باسیلوس ها و کلستریدیوم ها توانایی ایجاد هاگ درونی را دارند. هاگ سبب مقاومت باکتری در برابر عوامل نامساعد محیط می‌شود. هر باکتری فقط یک هاگ می‌سازد و از هر هاگ یک باکتری بوجود می‌آید. پس می توان گفت که هاگ زایی یا اسپور باکتری حالت غیر فعال باکتری در برابر شرایط سخت می باشد. مراحل هاگ زایی بدین شرح است که ابتدا یک نسخه از DNA باکتری ساخته و این نسخه جدید در محل تشکیل اسپور استقرار می یابد. باکتری کم کم آب آزاد خود را از دست داده و سیتوپلاسم خود را تغلیظ می کند. در این حالت میزان فعالیت سلول به حداقل می رسد. در طی هاگ زایی ساختار مزوزومی به سمت داخل باکتری فرورفتگی بیشتری می یابد و علاوه بر جدا کردن محل تشکیل اسپور از سایر قسمتها، می تواند بخشی از ساختمان اسپور هم تلقی شود. هر چند متابولیسم در

این ساختار به حداقل رسیده اما موادی جهت تشکیل اسپور ساخته می شود. از مهمترین موادی که در افزایش مقاومت اسپور اهمیت دارد، دی پی کولینات کلسیم است که از ترکیب اسید دی پی کولینیک و املاح کلسیم ایجاد می شود. از علل افزایش مقاومت باکتری در مرحله اسپورسازی وجود لایه های متعدد چهارگانه (غشای سیتوپلاسمی، دیواره اسپور با دو غشای درونی و بیرونی از جنس مانان، گلوکان، کیتوزان و دیتروزین، پوسته اسپور از جنس پروتئین و آخرین لایه اگزوپوریوم می باشد)، آب کم، ترکیبات خاص کولینیک و سیستئین فراوان می باشد. اسپور معمولا کروی شکل و پوسته خارجی آن ناصاف دیده می شود. اسپورها آنقدر مقاوم می شوند که می توانند تا ۴ ساعت آب جوش را تحمل و زنده بمانند.

۵-۴ مکانیسم اتصال و هضم باکتریایی

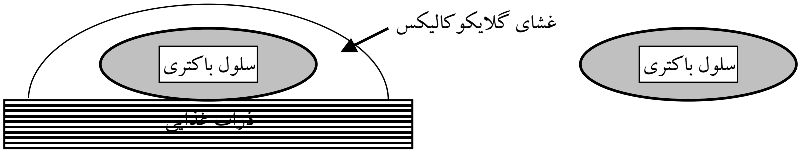
اتصال باکتری به مواد مغذی از مهمترین عوامل در هضم مواد غذایی می باشد. بدون اغراق می توان ۷۰ درصد هضم میکروبی مواد غذایی را در شکمبه دام ها به اتصال باکتری به ماده غذایی وابسته دانست. سرعت یا زمان اتصال از مهمترین فاکتورهای است که محققین را بر آن داشت تا جهت هضم بیشتر و مطلوب تر مواد غذایی آزمایشات ویژه ای روی آن انجام دهند. زمان اتصال باکتری ها به عناصر غذایی مانند سلولز و همی سلولز متفاوت بوده و براساس عامل موثر به سه دسته (۱) عامل باکتریایی شامل حالت غشای گلایکوکالیکس، رقابت بین گونه ای و سن باکتری، (۲) عامل ذره غذایی مانند نسبت کوتیکول، سطح تماس، قدرت آبگیری، ظرفیت یونی و تغییر قدرت آن و (۳) عامل محیطی مخزن تخمیر شامل اسیدیته (شرایط پایدار اتصال بین اسیدیته ۶ تا ۷ است)، حرارت (از ۴ تا ۵۰ درجه سانتی گراد امکان اتصال وجود دارد، اما بین ۳۳ تا ۳۸ درجه سانتی گراد بهترین شرایط اتصال دیده می شود)، فشار اکسیژن، غلظت قند محلول، پتانسیل اکسیداسیون و احیاء، فقدان کاتیون های یک و دو ظرفیتی، وجود مهار کننده های ATP آز غشایی، وجود محرک ها، یونفرها و به دهها عامل دیگر وابسته می باشد. بطور مثال؛ در حالت عادی باکتری رومینوکوکوس فلوفاسینس به سلولز بی درنگ متصل می شود، در حالیکه فیبروباکتر سوکسینوژنز به طور تقریبی ۲۰ تا ۳۰ دقیقه زمان جهت اتصال به سلولز وقت نیاز دارد. اما، علاوه بر عوامل فوق محققین موادی را کشف نموده اند که سبب جلوگیری از اتصال باکتری به سلولز و یا همی سلولز می گردد. این مواد از باکتری های مجاور ترشح تا سایر باکتری ها را از مواد غذایی دور و امکان دسترسی خود را بیشتر نمایند. با کاهش این دسته از مواد می توان سرعت تجزیه مواد مغذی مانند سلولز را بواسط افزایش اتصال باکتری به ماده غذایی افزایش داد. بطور مثال؛ معروف ترین ماده منع کننده یک پروتئین پپتیدی خاص از نوع باکتریوسین ها است که توسط

رومینوکوکوس آلبوس ترشح و فعالیت رومینوکوکوس فلوفاسینس را متوقف نماید. باکتریوسین ها قدرت مهار کنندگی متفاوت دارند و از محدود کردن یک باکتری تا چند باکتری پیش می روند. با کاهش عوامل مهار کننده می توان میزان اتصال باکتری ها را به مواد مغذی افزایش داد. مثال آشکار در این زمینه رقابت گونه های رومینوکوکوس ها با فیبروباکتر سوکسینوژنز می باشد، که در جهت اتصال به سلولز رقابت دارند. رقابت این دو گونه باکتریایی با کاهش مقدار سلولز شدت می یابد. اما بعضی از باکتری ها همانند یوباکتریوم سلولوسولونس دارای جایگاه اتصال مخصوص به سلولز بوده که عمدتا از جنس پروتئین می باشند. این جایگاه ها اجازه می دهند که باکتری ها با کمترین رقابت به فعالیت خود بپردازند. در این وضعیت تنها رقابت موجود مربوط به گسترش جمعیت گونه مشابه و کاهش جایگاه اتصال است. فرآیند اتصال باکتری به عناصر غذایی معلق در محتویات شکمبه در قاعده کلی به شرح ذیل صورت می گیرد:

(۱)- انتقال باکتری به سطح ماده غذایی؛ انتقال می تواند به احتمال بسیار کم توسط فعالیت تاژک یا مژک ها صورت گیرد. اما به دلیل فقدان ضمائم حرکتی در بعضی از باکتری ها مانند باکتری هضم کننده سلولز و همی سلولز فرضیه مخلوط شدن مواد غذایی و اتصال باکتری توسط آن به ذره غذایی بسیار قوی تر می باشد. با پذیرش فرضیه مخلوط شدن مواد غذایی، اندازه ذرات غذایی در میزان اتصال اولیه و آتی اهمیت زیادی پیدا می کند. محققین شرایط محیطی مخزن تخمیر را در انتقال باکتری به سطح مواد غذایی بدون تاثیر ندانسته و خواستار تحقیق بیشتر در این زمینه شده اند.

(۲)- اتصال غیر تخصصی به مناطق مختلف مواد غذایی؛ این نوع از اتصال به کمک غشای گلایکوکالیکس و با کمک نیروهای واندروالسی (آب دوستی، یونی و تعاملات الکترواستاتیک) در فاصله ۲ تا ۵۰ نانومتری باکتری به ذره غذایی صورت می پذیرد. این نوع اتصال می تواند برگشت پذیر بوده و علاوه بر نیروهای فوق، نیروی فیزیکوشیمیایی (ناشی از شکل و نوع حفره موجود در ذرات غذایی) در این نوع اتصال اهمیت بسزایی دارد. اتصال غیر تخصصی در باکتری گرم منفی با غشای خارجی گلایکوکالیکس مانند فیبروباکتر سوکسینوژنز و در باکتری گرم مثبت با پپتیدوگلیکان های خارج سلولی میکروب مانند رومینوکوکوس آلبوس انجام می گیرد (شکل ۵-۴). این اتصال بین ۵ تا ۳۰ دقیقه در باکتری های مختلف متفاوت دیده می شود. کوتین (بین ۱۸ تا ۲۴ درصد در بافت گیاهی باشد) و مواد مشابه آن مانند سیلیکا، ترکیبات فنولی موجود در لیگنین، تانن ها، بافت های اسکلرانشیمی و سایر ساختارهای دفاعی در علوفه و برگ های درختان اجازه اتصال باکتری به ذرات غذایی را نمی دهند. عمل خرد کردن توسط میزبان می تواند لایه های تشکیل شده از موانع اتصال را خرد و بخش های

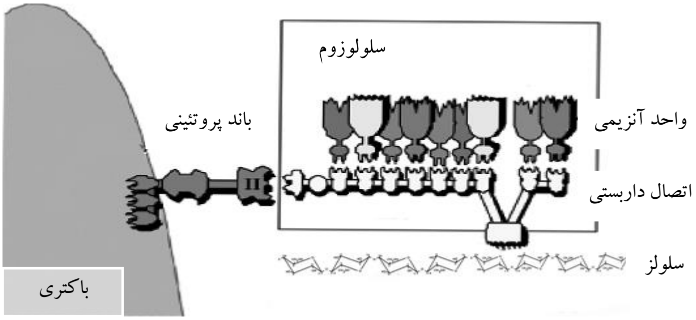
داخلی ذرات غذایی را جهت اتصال باکتری ها آماده نماید. خرد شدن لایه میانی (*Lamella*) که همواره با بخش لیگنینی در تماس است، می تواند فرآیند اتصال را سرعت ببخشد.



شکل ٥-٤ اتصال غیر تخصصی باکتری توسط غشای گلایکوکالیکس به ذرات غذایی.

(۳)- اتصال تخصصی به وسیله عوامل اتصال یا بازوهای اتصال؛ در این اتصال ابتدا یک برآمدگی کوچکی در سطح ماده غذایی بوسیله غشای گلایکوکالیکس باکتری و دیواره سلولی ماده غذایی ایجاد می شود. این برآمدگی را محققین مجموعه ای بسیار پیچیده به نام های سلولوزوم، در بعضی گونه ها وجود مژک (*pilli*)، لوله های کوچک پروتئینی-کربوهیدارتی گلایکوکالیکس، کپسول گلیکوکالیکس، فیبرهای سلولزی و همی سلولزی، پروتئین های اتصال کننده و نقاط خاص اتصال در سطح باکتری تعریف می کنند. سلولوزوم در بین سایر مکانیسم ها به دلیل آزمایشات مکرر در شناسایی نوع هضم فیبر شناخته شده تر و فراوان مشاهده می شود (شکل ۶-۴). این مکانیسم در طی تحقیقات میکروسکوپ الکترونی، بیوشیمیایی و ایمینوشیمیایی استوار و بر اساس گونه کلستریدیوم تشریح گردید. اتصالات سلولوزوم و آنزیم های وابسته آن به صورت داربستی با سلولز مرتبط بوده و با اتصال به آن تجزیه چندگانه خود را آغاز می کنند.

محققین جایگاه تخصص یافته ای هم برای تجزیه مواد پروتئینی شناسایی نموده اند، که با پیوندهای پروتئینی و آنزیم های متصل به دیواره سلولی اقدام به شکستن اتصالات پروتئینی می کنند. در طی تجزیه پروتئین پپتیدها به اسیدهای آمینه و نیتروژن آزاد تبدیل و جذب می شوند. آنزیم های تجزیه کننده پروتئین ناشی از باکتری های شکمبه به دو شکل آزاد در مایع مخزن تخمیر و متصل به دیواره سلولی باکتری ها دیده می شود. مکانیسم هضم پروتئین توسط باکتری ها متنوع بوده و این مکانیسم ها بر دو اصل (۱) هیدرولیز پروتئین (به پپتید و اسیدهای آمینه آزاد) و (۲) آمین زدایی (تجزیه اسیدهای آمینه) استوار می باشند. اما؛ در صورت محلول بودن ذرات غذایی و فقدان ذرات جامد در محیط شکمبه، مکانیسم اتصال باکتریایی متوقف و پدیده جذب از غشاء آغاز می گردد. این پدیده در مکانیسم سنتز پروتئین میکروبی و جذب نیتروژن از مایع شکمبه به وفور دیده می شود. وقتی نیتروژن محلول (اوره و یا بایوره) وارد شکمبه شد، توسط مکانیسم جذب وارد سلول باکتری و سنتز پروتئین میکروبی آغاز می گردد. قندهای محلول هم بدین صورت جذب باکتری و مورد استفاده قرار می گیرد.

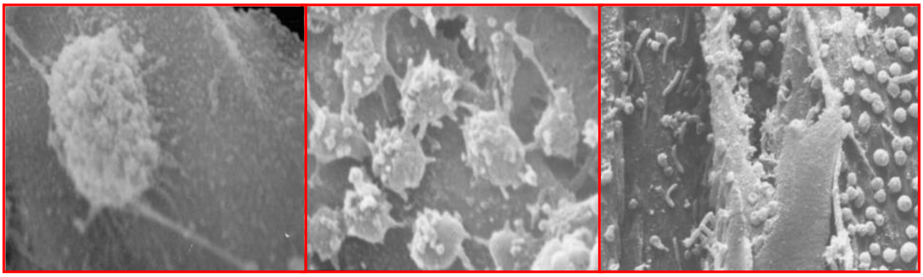


شکل ٦-٤ الگوی فعالیتی سلولوزوم بر روی سلولز.

(۴)- تکثیر باکتری ها بر سطح ماده مغذی و تجزیه سریع آن. برای بررسی میزان گسترش باکتری و تکثیر آن بر سطح ماده غذایی به خصوص فیبر می توان از سه روش (الف) آزمایشات زلال سنجی (*turbidimetric*) بر پایه تغییرات چگالی نور تابانده شده بر فیبر در حال هضم، (ب) آزمایشات تعیین میزان پروتئین باکتریایی بر روی فیبر و (ج) براساس رادیوپرتوها (*radiolabeled*) با C^{14} و H^{3} محاسبه می شود. از آنجا که بیش از ۷۰ تا ۸۰ درصد باکتری ها به مواد مغذی چسبیده و براساس شستشو از شکمبه خارج می شوند، تکثیر و نگهداری آنها در مایع معلق شکمبه جهت حضور مداوم الزامی می باشد. تحقیقات نشان می دهد که هر چقدر قدرت و سرعت تکثیر باکتری ها در روی مواد مغذی و شرایط محیطی شکمبه بیشتر باشد، احتمال حضور و عادت پذیری میکروب ها بیشتر می شود.

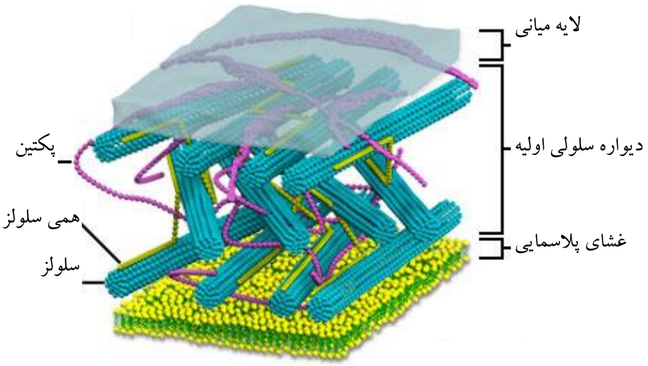
- **هضم باکتریایی**

برای تجزیه و هضم ذرات غذایی مانند فیبر و ذرات پروتئینی باکتری ها یک مخزن کوچک گوارشی در سطح غذا تشکیل و آنرا هضم می نمایند (شکل ۷-۴). هر بسته یا مخزن گوارشی حاصل از تجمع باکتری، حاوی تمامی آنزیم های مورد نیاز هضم یک ماده غذایی می باشد.



شکل ۷-٤ مخازن گوارشی ایجاد شده در سطح سلولز و همی سلولز توسط باکتری ها.

آنزیم های گوارشی شامل هضم کننده سلولز (سلولاز، زایلاناز و سلوبیاز) و یا همی سلولز (بتا و آلفا-گلوکوزیداز، بتا-زایلوزیداز، آلفا-آرابینوزیداز، پلی گالاکتوروناز، سلوزایلاناز، استیل زایلان استراز، زایلوبیوز فسفریلاز، زایلودکستریناز، زایلودکسترین فسفریلاز و آلفا ۴،۱ زایلاناز) می باشند. باکتری ها قندهای ساختمانی (تشکیل دهنده گان اصلی دیواره سلولی گیاهان مانند سلولز، همی سلولز، پکتین و لیگنین (شکل ۸-۴)) و غیر ساختمانی (فروکتوزان ها، نشاسته و اسیدهای ارگانیکی) را در دو مرحله خارج سلولی (هیدرولیز زنجیره و احداث واحدهای سازنده) و داخل سلولی (تخمیر به اسیدهای چرب مورد نیاز) هضم و تخمیر می نمایند. در بخش هضم خارج سلولی باکتری ها ابتدا به مواد مغذی چسبیده و آنزیم های خود را بین فضای خارج سلولی و ماده خوراکی (مخزن گوارشی) ریخته و آن را تجزیه می کنند.



شکل ۸-٤ ساختمان دیواره سلولی علوفه.

قندهای محلول یا غیرساختمانی می توانند در چند دقیقه تخمیر و هضم شوند. در حالیکه قندهای ساختمانی به آرامی و طولانی مدت تجزیه می شوند. نرخ هضم و تجزیه این مواد برحسب منبع، درجه خلوص مواد، پیوندهای شیمیایی عوامل سازنده و نوع مواد تشکیل دهنده متفاوت خواهد بود. بطور مثال؛ همی سلولز کتان از زایلوز و به نسبت کمتری اسیدهای اورونیک تشکیل شده است که قابلیت تجزیه پذیری خوبی دارد. و همی سلولز ذرت از زایلوز و آرابینوز ساخته شده است که در مقایسه با کتان قابلیت تجزیه پذیری کمتری دارد. قندهای شش وجهی (پیرانوزی) هم در مقابل قندهای پنج وجهی (فورانوزی) اتصالات شیمیایی محکم تری داشته و اسیدهای قوی تری برای هضم می خواهند. در اصل پیوندهای بتا محکم تر از پیوندهای آلفا می باشند. یکسری آزمایشات نشان داده است که سرعت تجزیه و تخمیر مواد قندی به شکل ذیل می باشد:

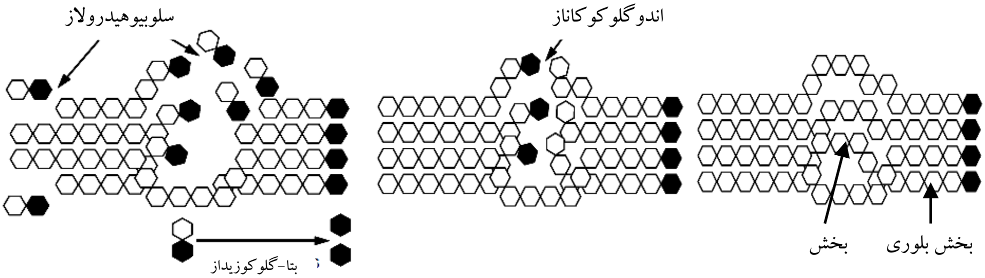
سلولز < همی سلولز < پکتین < نشاسته < فروکتان < قندهای محلول

وجود لیگنین در هر یک از بخش های ساختمانی سبب کاهش سرعت هضم مواد قندی می شود. در خوراک های مخلوط به دلیل وجود روابط پیچیده بین نشاسته و الیاف، نسبت بین مواد متراکم حاوی نشاسته و علوفه حاوی فیبر یا الیاف از مسائل مهم در سرعت تجزیه مواد قندی محسوب می شود. بطور مثال؛ نسبت ۴۰ به ۶۰ علوفه به مواد متراکم در مخزن تخمیر به دلیل کاهش نوسانات اسیدیته شکمبه و ترشح مناسب بزاق سرعت تخمیر مواد قندی ساختمانی بهتر از نسبت ۳۰ به ۷۰ علوفه به مواد متراکم به دلیل افزایش اسیدیته شکمبه و ترشحات کمتر مواد بافری بزاق در آن می باشد.

سلولز؛ از زنجیره های اصلی قند (۲۰ تا ۳۰ درصد ماده خشک علوفه) در دیواره سلولی علوفه محسوب می شود. سلولز یک رشته زنجیره ای بدون انشعاب خطی از ملکول بتا- گلوکوپیرانوز با واحدهای دی-گلوکزی و پیوند نوع بتا-۱،۴ می باشد. هر زنجیره سلولزی می تواند بیش از ۱۰ هزار واحد قندی داشته باشد و در دیواره اولیه و ثانویه سلول های علوفه و در بین زمینه همی سلولز قرار گیرد. سلولز توسط آنزیم خارج سلولی سلولاز باکتریایی خرد و به عناصر سازنده سلوبیوز (دو واحد قندی) و گلوکز (واحد قندی) تبدیل می شود. اولین ماده هیدرولیز شده از آنزیم سلولاز زنجیره های آنهیدرو-گلوکز و الیگوساکاریدهایی است که از ۲ تا ۱۰ واحد مونومری تشکیل شده اند، می باشد. پس از تجزیه کامل سلولز، واحدهای گلوکز آزاد شده در درون سلول باکتری به پیروات تخمیر می شود. هر فیبر سلولزی (۵۰۰ هزار ملکول سلولزی سازنده یک فیبر سلولزی می باشد) مجموعه ای از زنجیره های خطی کنار هم هستند که به صورت موازی مشاهده می شوند. این مجموعه در نقاط گسترده دارای ساختار بلوری (منظم) و در بعضی از سطوح دارای ساختار غیر بلوری (بی نظم) می باشند (شکل ۹-۴). خاصیت بی نظمی که سبب موج دار دیده شدن تارهای سلولزی می شود، به نوع آرایش اتصالات شیمیایی ترکیب باز می گردد.

همی سلولز؛ ترکیبی است که بوسیله محلول قلیایی آبی شناسایی و به طور بی شکل و تقریبا کریستالی مشاهده می گردد. این ماده تقریبا ۱۴ تا ۲۵ درصد ماده خشک علوفه را تشکیل می دهد. همی سلولز دارای ترکیب پلیمری از قندهای پنتوز با پیوند بتا- ۴،۱ است. در واقع این ماده ترکیبی از واحدهای زایلوز، مانوز، اسیدهای اورونیک (گلوکورونیک و گالاکتورونیک)، گروه های استیل، ال-رامنوز و احتمالا گالاکتوز و آرابینوز می باشد. البته در این پلیمر پیوندها بتا-۳،۱ بین آرابینوز و زایلوز و بتا-۲،۱-بتا-۳،۱ بین زایلان و اسیدهای اورونیک دیده می شود. زنجیره های همی سلولز کوچکتر از سلولز بوده و علاوه بر محصور کردن زنجیره های سلولز در خارج لایه ها، در داخل لایه های دیواره سلولی برگ ها نیز مشاهده می شوند. این ترکیب با لیگنین پیوندهای اشتراکی فراوانی دارد. آنزیم همی سلولاز خارج سلولی باکتری این ترکیب را مورد حمله قرار داده و بیشتر واحدهای زایلوبیوز را تولید می

کند. سپس واحدهای تولیدی توسط آنزیم داخل سلولی باکتری به زایلوز تبدیل می شوند. قندهای ساده حاصل از همی سلولز به دنبال تجزیه مذکور و از طریق مسیر پنتوز فسفات به فروکتوز و گلیسر آلدئید تبدیل می گردند.



شکل ۹-٤ ساختمان بلوری و غیربلوری سلولز همراه با تخریب سلولز توسط آنزیم های اندوگلوکوکاناز، اگزوگلوکاناز (سلوبیوهیدرولاز) و بتا-گلوکوزیداز از راست به چپ.

تحقیقات نشان می دهد که برای هضم سلولز و همی سلولز توسط باکتری ها به تعدادی فاکتور جهت افزایش سرعت تجزیه مورد نیاز است. این فاکتورها در مخزن تخمیر شناخته شده (مانند اسیدهای چرب شاخه دار ایزوبوتیریک، ایزووالریک و ۲ متیل بوتیریک همراه با مشتقات آنها، اسیدهای بدون شاخه و با کربن کم C8-C5، پاراآمینو بنزوئیک اسید، بیوتین، بعضی از ویتامین های سری B، گروه معدنی فسفات، آمونیوم، کلسیم، سدیم، منیزیوم و پتاسیم) و گاه ناشناخته می باشند. اسیدهای چرب شاخه دار می توانند بعنوان اسکلت کربنی اسیدهای آمینه سنتز شده (والین، لوسین و ایزولوسین) توسط باکتری ها بکار گرفته شده باشند. اما علاوه بر این عوامل، قندهای محلول هم بر سرعت و مقدار هضم سلولز و همی سلولز توسط باکتری موثر می باشند. این تاثیر به احتمال فراوان به اسیدیته مخزن ناشی از فعالیت باکتری های خاص بر روی قندهای محلول وابسته است و هر چه میزان آن زیادتر گردد، به دلیل افزایش اسیدیته، میزان هضم سلولز و همی سلولز کاهش می یابد. حداکثر اتصال باکتری ها به سلولز و همی سلولز در اسیدیته ۶ می باشد که در صورت افزایش آن به ۵ و ۴ سبب مهار این اتصال می شود.

پکتین؛ تقریبا ۱۰ درصد ماده خشک علوفه را تشکیل می دهد. مواد پکتینی از واحدهای اسید دی-گلوکورونیک و دی-گالاکتورونیک با اتصالات آلفا-۱،۴ و بتا-۱،۴ بوجود می آیند. کربوکسیل این واحدها می توانند به صورت کامل (اسید پکتیک) و یا بخشی از آن (اسید پکتینیک) با الکل متیل استریفه و محافظت شوند. مواد پکتینی به سه بخش اسیدهای پکتیک، اسیدهای پکتینیک و پروپکتین ها تقسیم می شوند. اسیدهای پکتیک واحد زنجیره ای از ۵ تا ۱۰۰ اسید دی-گالاکتورونیک و اسیدهای پکتینیک از ۱۰۰ تا ۲۰۰ واحد دی-گالاکتورونیک تشکیل شده اند. پروپکتین ها از ملکول های سنگین

تشکیل شده و ممکن است با سلولز همراه شوند. پکتات که ناشی از اتصال کلسیم با گروه کربوکسیل واحدهای پکتینی حاصل می گردد، از سایر مواد پکتینی است که سبب کاهش انعطاف پذیری گیاهان می شود. آنزیم های هاضم پکتین توسط باکتری ها متیل استراز و پلی گالاکتورونیداز خارج سلولی می باشد. واحدهای پکتین از طریق مسیر پنتوز فسفات به فروکتوز و گلیسر آلدئید تبدیل می شوند. در زمان تجزیه پکتین موادی مانند متانول و اسیدهای آلی هم تولید می گردد. در تجزیه پکتین دو مکانیسم آنزیمی با خاصیت داخل و خارج سلولی شناسایی شده است. مکانیسم اول آنزیم پکتین استراز است، که گروه های متیل استری را هیدرولیز می نماید. فعالیت این آنزیم بر روی مواد پکتینی سبب تولید متانول و اسید پکتیک می شود. مکانیسم دوم آنزیم شناخته شده دپلیمرازها مانند هیدرولازها و لیازها می باشد، که در تجزیه و تخریب اتصالات آلفا گلیکوزیدی فعالیت می نمایند. آنزیم هیدرولاز با تخریب پکتین تولید متیل گالاکتورونات و آنزیم لیاز متیل اولیگوگالاکتورونات را رقم می زند. باکتری ها جهت تجزیه پکتین و تبدیل آن به واحدهای ساده تر مشابه روش اتصال به سلولز و همی سلولز عمل می نمایند.

لیگنین؛ را اگر چه نمی توان یک قند نامید، اما ترکیب اساسی چوب و کاهنده اصلی هضم سلولی گیاهی را در ردیف قندها طبقه بندی می کنند. در اصل لیگنین یک زنجیره بی حرکت از بقایای فنیل پروپان است که مهمترین ترکیب اصلی آن از گروه های فنولی می باشد. سه واحد مونومری الکلی که به طور وسیع در لیگنین مشاهده می شوند شامل کوماریل، کونیفریل و سیناپیل می باشد. ترکیباتی چون گروه های بنزوئیک و وانیلین در ساختار آنها مشاهده می شود. گروه های الکلی می تواند از فنیل آلانین و تیروزین سنتز شوند. لیگنین فضای بین دیواره سلولی را بویژه دیواره اولیه و مقدار کمی هم در دیواره ثانویه اشغال می کند. این حالت را چوبی شدن دیواره اولیه و لایه میانی می نامند. از آنجا که چوبی شدن دارای یک شکل خاصی نمی باشد و از واحدهای متنوعی در طبیعت ساخته می شوند، هیچ آنزیم شناخته شده ای در باکتری ها برای هضم آن کشف نشده است. مونومرهای فنولیک در برابر هضم آنزیم باکتری ها مقاوم و سبب کاهش هضم اتصالات گیاهی مرتبط با آن می شود. براساس همین واحد فنولی می توان لیگنین را به دو شکل متراکم با وزن ملکولی بالا (هر واحد فنولی دارای سه اتصال شیمیایی می باشد) و غیر متراکم با وزن ملکولی پایین (دارای پیوندهای استری و گاه اتری هم هستند) طبقه بندی کرد. پیوند لیگنین با سایر قندها به شکل کووالانسی قوی است. لیگنین متراکم از تجمع لیگنین غیر متراکم با اتصالات استری همی سلولز حاصل شده است. واحد الکلی کوماریل فقط با لیگنین متراکم مشاهده می شود. تعداد کمی از گونه های قارچی هوازی هستند که می توانند لیگنین را تجزیه نمایند. ترکیبات فنولی لیگنین (به احتمال قوی کوماریل و کونیفریل) دارای اثر مهار کنندگی

فعالیت هضم میکروبی می باشند. این ترکیبات با تماس به غشای میکروبی سبب متلاشی شدن آنها شده و باکتری را می کشد.

نشاسته؛ زنجیره ای از واحدهای مالتوز است که بوسیله پیوندهای آلفا-۱،۴ به هم پیوسته اند. مالتوز خود از دو واحد قندی گلوکز تشکیل شده است. ملکول نشاسته از دو واحد ساختاری آمیلوز که دارای یک زنجیره ساده (۱۵ تا ۳۰ درصد) بدون انشعاب با ۵۰۰ تا ۲۰۰۰۰ واحد آلفا ۴،۱ دی گلوکز و آمیلوپکتین با ساختمان مرکب انشعابی (۷۰ تا ۸۵ درصد) از واحدهای آلفا ۱،۴ دی گلوکز با ۱ تا ۲ میلیون واحد قندی تشکیل شده است. همچنین، زنجیره جانبی ترکیب آمیلوپکتین از ۳۰ واحد قندی ساخته شده و همانند سلولز دارای دو بخش بلوری و غیر بلوری می باشد. ناحیه بلوری در آمیلوپکتین ها بصورت حلقه هایی اطراف یک مرکز بنام Hilum دیده می شود که از تعداد زیادی زنجیره های قندی موازی هم تشکیل شده است. غالب اتصالات موجود در آمیلوپکتین و آمیلوز پیوند هیدروژنی می باشد. لذا به دلیل پیوندهای هیدروژنی متکی به آب از نظر بافت شناسی دانه های نشاسته هر گیاه با گیاه دیگر متفاوت خواهد بود. براساس خواص بلوری، قابلیت هضمی نشاسته در هر گیاه متفاوت و با فرآیند حرارتی بالای ۶۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد که شکننده ساختمان بلوری نشاسته می باشد، تا ۹۰ درصد قابلیت هضمی آن افزایش می یابد. محققین نشاسته گیاهان را به دو بخش عمده طبقه بندی می کنند: نوع اول؛ نشاسته غلات با زنجیره های کوتاه ساختمانی و نوع دوم؛ نشاسته ریشه ها و غده ها با زنجیره های طولانی. باکتری های شکمبه با تولید آنزیم های آمیلاز، مالتاز، ایزومالتاز و ۱،۶ آمیلوپکتیناز واحدهای نشاسته را به عناصر سازنده آن یعنی گلوکز تبدیل می کنند. در میزان تجزیه پذیری نشاسته توسط باکتری ها عوامل متعددی مانند نوع نشاسته مصرفی (غلات یا ریشه ها)، نرخ مصرف، فرآوری های مواد حاوی نشاسته و اثر مواد مکمل دخالت دارند.

۶-۴ جمعیت باکتری ها در شکمبه

از آنجا که باکتری های شکمبه نقش اساسی و حیاتی در تخمیر مواد غذایی فیبری و غیر فیبری بازی می کنند، کنترل جمعیت و جلوگیری از حذف گونه های مطلوب آنها اهمیت بسزایی در تولیدات دامی خواهد داشت. باکتری های شکمبه به ساده ترین شکل از طریق تماس دام با دام، خوراک، آب مصرفی و تماس با جایگاه دام انتقال می یابند. پس از انتقال، جمعیت باکتریایی بسیار سریع در شکمبه دام ها جایگزین و توسعه آنان آغاز می شود. اما عوامل بسیاری بر توسعه جمعیت میکروارگانیسم های شکمبه به خصوص باکتری ها اثر می گذارند. ذکر همه عوامل مذکور سخت و مشکل به نظر می رسد. لذا می توان همه آنها را در سه طبقه خوراک، خصوصیات محیطی مخزن تخمیر و عوامل بیرونی مورد بررسی

قرار داد. اهمیت جمعیت باکتریایی زمانی روشن تر می شود که بدانیم جمعیت باکتری های شکمبه (۷۵ درصد از کل باکتری های دستگاه گوارش در شکمبه استقرار یافته اند) براساس شرایط تغذیه بین ۴۰ تا ۵۵ درصد توده میکروبی شکمبه را که قابلیت هضم ۸۵ درصدی برای میزبان دارد، شامل می گردد. این توده میکروبی تقریبا قادر به هضم نیمی از مواد غذایی مصرف شده می باشند. افزایش جمعیت باکتریایی نشان از تخمیر بالا و کارآیی بهتر خوراک مصرفی و همچنین نشان از تعادل حضور گونه های مختلف باکتریایی است.

۴-۶-۱ اثر خوراک بر جمعیت باکتری ها

می توان گفت یکی از مهمترین عواملی که بر جمعیت و توزیع گونه های مختلف باکتریایی موثر واقع می شود، خواص فیزیکی و شیمیایی خوراک مصرفی است. این خاصیت را می توان در سه اصل دفعات خوراک دهی، سطح خوراک و ترکیب جیره مورد گفتگو قرار داد.

۱- **دفعات خوراک دهی**؛ از آنجا که باکتری ها در مقابل گرسنگی به دلیل تغییر اسیدیته، اکسیداسیون- احیاء و تغییر فشار اسمزی مایع شکمبه حساس هستند، با افزایش تعداد دفعات خوراک دهی می توان این تغییرات را به حداقل رساند و حضور آنها را در محیط شکمبه افزایش داد. قطع ناگهانی و یا تغییرات نامناسب در تعداد دفعات خوراک دهی می تواند از حداکثری شدن جمعیت باکتری های شکمبه ممانعت به عمل آورد. تغییرات روزانه جمعیت باکتری ها براساس مصرف خوراک و دفعات آن نشان داده است که قبل از مصرف غذا غلظت باکتری ها پایین بوده و در طول ۰ تا ۵ ساعت بعد از خوراک دهی این میزان پلکانی بالا می رود. البته کیفیت جیره مصرفی می تواند روند افزایشی باکتری ها را با تغییراتی روبرو نموده و آن را از حالت عادی خارج کند. این تغییر حالت می تواند ناشی از افزایش اسیدیته و یا شسته شدن باکتری ها ناشی از عبور مواد غذایی از شکمبه باشد. البته تغییر جمعیت باکتری ها در دفعات بالای خوراک دهی به دلیل ثبات بیشتر محیط شکمبه و در شرایط آزمایشگاهی به دلیل ترقیق ناچیز آن با نوسان کمتری روبرو خواهد بود.

۲- **سطح خوراک دهی**؛ سطح خوراک دهی از فاکتورهای مهم دیگری در تعیین غلظت باکتری ها می باشد. آزمایشات نشان داده است که شکل جیره و اثر آن بر سطح مصرف خوراک می تواند تاثیر سریعی بر غلظت باکتری ها و سایر میکروارگانیسم های شکمبه داشته باشد. بطور مثال؛ جیره های فرآوری شده (به طور فیزیکی) سبب ازدیاد مصرف ماده غذایی و سپس حذف بعضی گونه های باکتریایی شود. این کاهش شدید و یا حذف کامل می تواند ناشی از دو عامل کلیدی نرخ عبور و اسیدیته شکمبه (افزایش اسیدیته شکمبه به دلیل آزاد شدن ذرات غذایی از بافت های خرد شده سبب

برهم خوردن تعادل در باکتری ها می گردد) صورت گیرد. با افزایش مصرف خوراک نرخ عبور سریعتر می گردد و احتمال عبوری شدن باکتری ها و کمبود زمان تکثیر جهت بقا قوت خواهد گرفت. اما کاهش یک گونه باکتریایی چون با افزایش گونه دیگر همراه است احتمال تغییر جمعیت باکتری های شکمبه را کاهش خواهد داد. اما در بررسی های دینامیکی امروزه مشخص شده است جمعیت باکتری ها تا حد مشخصی از فرآوری، افزایش می یابند. بدین صورت که با کاهش اندازه قطعات علوفه گراس جمعیت باکتری ها از ۱۰۹ × ۱۰/۵ در هر گرم از محتویات شکمبه به ۱۰۹ × ۱۵/۷ در هر گرم از محتویات شکمبه خواهد رسید. ولی در صورت ریزتر شدن قطعات جمعیت باکتری ها به دلیل سرعت عبور بالاتر کاهش می یابند.

۳- **ترکیب خوراک مصرفی؛** کارشناسان درباره تغییرات ترکیب جیره جهت کنترل جمعیت باکتری ها اتفاق نظر مطلوبی دارند. علت آن را می توان به مشخص بودن نوع باکتری های حاضر در شکمبه و خوراک مصرفی آنها مرتبط دانست. تغییرات گسترده جیره در مراتع و جایگاه ها به خاطر متغیر بودن خاستگاه تامین جیره، مراحل رشدی متفاوت در گیاهان مصرف شده، محرک ها و محدود کننده های تغذیه ای و تنوع گونه های خوراکی و گیاهی حتی موجود در یک خانواده می تواند عوامل موثر در تغییر ترکیب جیره غذایی و بالطبع تغییر جمعیت باکتریایی دانست. محققین بر این باور هستند که تغییر جیره از حالت علوفه کامل به جیره میانی و سپس به جیره حاوی ۱۰۰٪ مواد متراکم می تواند غلظت باکتری ها را از حالت سلولایتیک به آمیلولایتیک دگرگون نموده و جمعیت باکتری ها را کاملا تغییر دهد. افزایش انرژی جیره می تواند یکی از عوامل ازدیاد غلظت باکتری های به خصوص نوع آمیلولایتیک آنها در شکمبه باشد. اما این افزایش همیشگی نبوده و به تدریج با افت pH کاهش می یابد. سطوح انرژی با تنظیم پروتئین می تواند اثری مناسب برای همه باکتری ها داشته باشد، اما این افزایش به شکل خاصی تابع نوع انرژی تامین شده و منابع کربنی آن دارد. تغییرات ترکیبات جیره مانند جایگزینی نوع علوفه از تازه به خشک و بالعکس، تغییر جنس علوفه، تغییر نوع و ترکیبات پروتئینی مانند پروتئین گیاهی به جانوری و یا پروتئین واقعی به غیر واقعی و تغییر منابع انرژی زا مانند نوع دانه مصرفی یا چربی و دهها موارد دیگر می تواند بر جمعیت و غلظت گونه های باکتری به شدت موثر واقع شوند.

۲-۶-۴ اثر خصوصیات مخزن تخمیر بر جمعیت باکتری ها

خصوصیات مخزن شکمبه بیشترین تاثیر را بعد از خوراک مصرفی بر جمعیت باکتری های شکمبه خواهد داشت. خصوصیات مخزن تخمیر وابسته به کمیت و کیفیت خوراک مصرفی می باشد. بعد از

فراهم آمدن آب و خوراک به حد متعارف شرایط زیستی مخزن تخمیر مانند اسیدیته شکمبه، فشار اسمزی، اکسیداسیون-احیاء، دما و نرخ عبور که بر هم دیگر اثرات مستقیمی خواهند داشت، معیارهای اصلی بر جمعیت باکتری ها و سایر ارگانیسم ها می باشند. اسیدیته که تحت تاثیر مواد غذایی و بافرهای بزاقی می باشد، اصلی ترین عامل بر جمعیت باکتری ها خواهد بود. اسیدیته بین ۶ تا ۷ بهترین دامنه pH برای فعالیت باکتری ها است. استفاده از خوراک علوفه ای اسیدیته را به دامنه مطلوب نزدیک و مواد متراکم آن را از دامنه مطلوب دور می کند. با افزایش اسیدیته جمعیت باکتری های سلولایتیک و متان زا کاهش و در اسیدیته بالای ۴/۵ فعالیت باکتری های آمیلولایتیک هم کاملا متوقف می شود. علت توقف می تواند انباشته شدن یون هیدروژن باشد. البته در حالت دینامیک اسیدیته بین ۶-۵ سبب افزایش نرخ عبور و بالطبع سبب کاهش تدریجی باکتری ها (به دلیل شسته شدن و زمان ماندگاری کم آنها جهت تجدید نسل) خواهد شد، اما این کاهش در صورت ثابت ماندن اسیدیته در این دامنه بی معنی خواهد بود.

پتانسیل اکسید و احیاء در شکمبه براساس شرایط طبیعی دارای دامنه ۰/۳۲- تا ۰/۳۷- ولت می باشد. هر عاملی مانند تغییرات یون های کاتیونی و آنیونی، تغییرات نامطلوب اسیدیته در اثر انباشتگی هیدروژن و یا مصرف آمونیاک اضافی سبب تغییر این دامنه گردد، می تواند حوضه فعالیتی باکتری ها را محدود و جمعیت آنها را کاهش دهد. همچنین، تغییر اسمولاریته از معیارهای مهم دیگری است که همانند پتانسیل اکسید و احیاء بر غلظت همه میکروارگانیسم ها بخصوص باکتری ها موثر می باشد. تغییر اسمولاریته مایع شکمبه از حالت ایزوتونیک به وضعیت هیپوتونیک (بلافاصله بعد از نوشیدن زیاد آب و مصرف خوراک مایع)، سبب مرگ تدریجی دسته ای از باکتری ها (سلولایتیک) و افزایش دسته دیگر (آمیلولایتیک) را رقم می زند. حالت هیپرتونیک سبب افزایش گروه سلولایتیک و کاهش تدریجی گونه های آمیلولایتیک خواهد شد.

دما و نرخ عبور از معیارهای بعدی در کنترل جمعیت باکتریایی شکمبه محسوب می شوند. بهینه ترین دما برای فعالیت های باکتریایی ۳۷ تا ۴۰ درجه سانتی گراد می باشد. با افزایش و کاهش دما بیش از دامنه مزبور فعالیت باکتری ها به تدریج کاهش و بعضی از گونه های آنها به مرحله هاگ سازی وارد می شوند. در کاهش تدریجی دما باکتری های گرم مثبت به دلیل ساختار دیواره سلولی مقاومت بیشتری از خود نشان می دهند. لذا جمعیت آنها در دمای پایین مقابل گرم منفی ها بیشتر نمایان خواهد شد. نرخ عبور هم براساس عدم انطباق با سرعت تجدید نسل باکتری ها می تواند سبب کاهش یا افزایش جمعیت های باکتری ها گردد. نرخ عبور خود به کمیت و کیفیت خوراک مصرفی و اسیدیته شکمبه وابسته خواهد بود.

۳-۶-۴ اثرات بیرونی مخزن تخمیر بر جمعیت باکتری ها

گزارشات ارئه شده حاکی از آن است که علاوه بر اثرات خوراک و محیط شکمبه در جمعیت گونه های باکتریایی، میزبان، اقلیم و رفتار گونه های باکتریایی می تواند به شکل موثری بر تراکم و حضور باکتری ها موثر واقع شوند.

۱- **اثر اقلیم و شرایط جغرافیایی؛** به دلیل پراکنش قدرتمند باکتری ها اکثر فلور میکروبی گیاه خواران و بخصوص بین گونه های یکسان جانوری مشابه بوده و تنها در نسبت های بین گونه ای باکتری ها تفاوت دیده می شود. تفاوت در نسبت های بین گونه ای باکتریایی مربوط به تنوع گونه های گیاهی و کیفیت آنها می باشد. بطور مثال؛ نسبت گونه های میکروبی در مناطق حاره بیشتر از نوع سلولایتیک بوده و در مناطق کوهستانی با دوره کوتاه مدت سرما نسبت مساوی از سلولایتیک و آمیلولایتیک می باشد.

۲- **اثر رفتارهای باکتری؛** محققین در سال های اخیر متوجه شده اند که باکتری ها برای دستیابی به مواد مغذی بیشتری یکسری رفتارهای مشارکتی و رقابتی (آگاهانه و ناآگاهانه) در مقابل هم انجام می دهند. رقابت سبب کاهش گونه مغلوب و ازدیاد گونه غالب و مشارکت سبب افزایش هر دو گونه باکتریایی می شود. روابط مشارکتی را می توان در گونه های مختلف مانند گونه های متان زا را با گونه های سلولایتیک نام برد که یکی برای دیگری شرایط تخمیر را مساعد می کند و دیگری مواد غذایی اولیه را جهت رشد تامین می نماید. موارد رقابتی هم بیشتر براساس ترشح محصولات تخمیری (به صورت ناآگاهانه) و سپس ترشح مواد سمی مانند باکتریوسین ها (به شکل آگاهانه) شکل می گیرد. باکتری های آمیلولایتیک سبب افت pH شکمبه شده و امکان فعالیت باکتری های سلولایتیک را کاهش داده و جمعیت آنها را کاهش می دهد. اما در رقابت آگاهانه همه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی موادی پپتیدی شبه آنتی بیوتیک به نام باکتریوسین ترشح و فعالیت باکتری مجاور خود را متوقف می نمایند. در این راستا باکتری هایی با هم رقابت آگاهانه می کنند که فنوتیپ یکسان اما ژنوتیپ متفاوتی از خود نشان می دهند. وجود باکتریوسین ها در سویه های مختلف مانند بوتیرویبریوها، لاکتوباسیلوس ها و رومینوکوکوس ها به اثبات رسیده است. ساده ترین مثال در این زمینه مربوط به اثر متقابلی فیبروباکتر سوکسینوژنز و رومینوکوکوس فلاووفاسینس در هضم سلولز می باشد.

۳- **اثر میزبان بر باکتری ها؛** تناسب گونه های مختلف باکتریایی می تواند براساس گونه جانوری تغییر نماید. این تغییر براساس تخصصی شدن میزبان صورت می گیرد. مثلا باکتری های کوکسی گرم مثبت و باسیلی گرم منفی در همه گیاه خواران وجود دارد، اما در دام های وحشی به خصوص گوزن

سانان بیشتر دیده می شود. و یا باکتری های جدا شده از شکمبه گاومیش مثل باکتروئید آمیلوفیلوس، بوتیری ویبری فیبری سولونس، سیلوباکتریوم سلوسولونس و کلستریدیم لوکدی بیشتر از گاو بوده و رومینوکوکوس آلبوس، رومینوکوکوس فلاووفاسینس، استرپتوکوکوس بوویس، باکتروئید رومینوکولا و سوکسینوموناس آمیلولایتیکا در گاوها بیشتر از گاومیشی می باشد که در کنار هم تغذیه می شدند. فرضیه اثر میزبان بر فعالیت های باکتریایی شکمبه به واسطه تفاوت میزان هضم مواد غذایی مشابه در گونه های مختلف جانوری قوت گرفته است. بطور مثال؛ قدرت هضم مواد فیبری در دام های اهلی و وحشی و حتی در بین گونه های یکسان جانوری اما در دو زیستگاه متفاوت یکسان مشاهده نمی شود. این تفاوت می تواند براساس میزان فعالیت گونه های خاص باکتریایی و یا افزایش یک گونه در مقابل گونه های دیگر باکتریایی باشد. گاومیش ها برخلاف گاوان قدرت هضم سلولز و لیگنین بیشتری داشته و جمعیت باکتری های آمیلولایتیک و پروتئولایتیک در آنها هنگام استفاده از مواد پرتراکم ۵ تا ۷ برابر بیشتر از گاوها می باشد. تخصصی شدن میزبان می تواند براساس عامل فیزیولوژیکی دام (نوع و مقدار خوراک مصرف شده براساس ساختار دهانی و شکمبه ایی، کیفیت و کمیت بزاق تولیدی و سرعت ترقیق خوراک از شکمبه) بر تراکم گونه های مختلف باکتریایی موثر واقع شود. عامل فیزیولوژیکی به نوبه خود می تواند بر خصوصیات محیطی شکمبه تاثیر بگذارد.

٤- **اثر سایر میکروارگانیسم ها؛** دو میکروارگانیسم ویژه وجود دارد که بر جمعیت باکتری ها نقش اساسی ایفا می کنند. این دو میکروب شامل باکتریوفاژها و پروتوزوئرها می باشند. باکتریوفاژهای شکمبه باعث لیز شدن باکتری ها شده و علاوه بر کاهش کارآیی خوراک مصرفی، سبب ترن آور پروتئین در مخزن تخمیر می شود. از آنجا که باکتریوخوارها به تعداد کافی در شکمبه حضور دارند، می توانند بر جمعیت باکتری ها موثر واقع شوند. البته باکتریوفاژها برای باکتری ها به عنوان حامل (وکتور) ژن عمل نموده و نهایتا تغییر ژنتیکی باکتری های شکمبه را سبب می شوند. تخمین زده می شود که تعداد آنها حدود ۱۰۷ × ۵ فاژ در میلی لیتر از مایع شکمبه باشد. امروز بیش از ۱۳۰ باکتریوفاژ که از لحاظ ریخت شناسی متفاوت هستند، شناسایی شده اند. پروتوزوئرهای شکمبه هم اثر بسزایی بر جمعیت باکتری ها خواهند داشت. پروتوزوئرها علاوه بر بلعیدن مواد غذایی اقدام به تجزیه باکتری ها در واکوئل های گوارشی خود نموده و جمعیت باکتری ها را تحت تاثیر قرار می دهند. اثر پروتوزوئرها بر باکتری ها در فصل پنج به تفصیل بیان شده است.

۴–۷ برای مطالعه بیشتر

- Axelsson, L., A. Holck. (1995). The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from Lactobacillus sake. J. Bacteriol, 177: 2125-2137.
- Brooker, J. D., L. A. O'Donovan, I. Skene, K. Clarke, L. Blackall, P. Muslera. (1994). Streptococcus caprinus sp. nov., a tannin resistant ruminal bacterium from feral goats. Lett. Appl. Microbiol., 18: 313–318.
- Bryant, M. P. (1977). Microbiology of the rumen. Cornell University Press, Ithaca, N. Y.
- Bryant, M. P. (1970). Normal flora rumen bacterial. J. of Clinical Nutrition. Vol. 23, No. 11, pp. 1440-1450.
- Church, D. C. (1988). The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall.
- Cronje, P. B. (2000). Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction. Cabi publishing, ISBN 0 85199 4636.
- Dehority, B. A. (2003). Rumen microbiology. Nottingham University Press. ISBN 1 897676 99.
- Dehority, B. A., P. A. Tirabasso. (2001). Effect of feeding frequency on bacterial and fungal concentrations, pH, and other parameters in the rumen. J Anim Sci. 79:2908-2912.
- Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt. (2007). The Prokaryotes. 3rd ed. Springer-Verlag, New York.
- Eadie, J. M. (1962). The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. J. gen. Microbiol. 29: 563-578.
- Flint, H. J., V. Aurilia, J. Kirby, K. Miyazaki, M. T. Rincon-Torres, S. I. McCrae, J. C. Martin. (1999). Organization of plant cell wall degrading enzymes in the ruminal anaerobic bacteria Ruminococcus flavefaciens and Prevotella bryantii. Pages 511–519 in Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation. K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita, and T. Kimura, eds. Publishers, Tokyo, Japan.
- Garthright, W. E. (1998). Appendix 2. Most probable number form serial dilutions. FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th ed., Rev. A. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- Gancz, H., O. Niderman-Meyer, M. Broza, Y. Kashi, E. Shimoni. (2005). Adhesion of vibrio cholerae to granular Starches. J. Enviromental Microbiology. p: 4850-4855.

- Goldman, N. (1996). Phylogenetic estimation. In: Bishop, M. J., C. J. Rawling (eds) DNA and Protein Sequence Analysis. IRL Press, Oxford, U.K., pp. 279-312.
- Hespell, R.B., D.E. Akin, B.A. Dehority. (1997). Bacteria, fungi and protozoa of the rumen. International Thompson Press, New York.
- Hespell, R. B., R. Wolf, R. J. Bothast. (1987). Fermentation of xylans by butyrivibrio fibrisolvens and other ruminal bacteria. J. Enviromental Microbiology. p: 2849-2853.
- Hobson, P. N. (1989). The rumen microbial ecosystem, Elsevier Applied Science, London.
- Hobson, P. N., C. S. Stewart. (1997). The rumen microbial ecosystem. 2ed. Chapman & Hall, Suffolk, UK. ISBN 0 7514 0366 0.
- Hoogeraad, N. J., F. J. R. Hird, I. Holmes, N. F. Millis. (1967). Bacteriophages in rumen contents of sheep. J. gen. Viro, 1: 575-576.
- Hungate, R. E., M. P. Bryant, R. A. Mah. (1964). The rumen bacteria and protozoa. Annual Review of Microbiology 18:131-166.
- Hungate, R. E. (1975). The rumen microbial ecosystem. Annual Review of Ecology and Systematics 6: 39-66.
- Hungate, R. E. (1966). The rumen and its microbes. London: Academic Press.
- Huangt, L. I., C. W. Forsberg. (1990). Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in fibrobacter succinogenes subsp. succinogenes S85. J. Enviromental Microbiology. p: 1221-1228.
- Imam, S. H., J. Michael Gould. (1990). Adhesion of an amylolytic arthrobacter sp. to starch containing plastic films. J. Enviromental Microbiology. p: 872-876.
- Imam, S. H., J. Michael Gould. (1991). Adhesion of lactobacillus amylovorus to insoluble and derivatized cornstarch granules. J. Enviromental Microbiology. p: 1128-1133.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, B. Ray. (1995) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol Rev 59: 171-200.
- Klieve, A. V. (1991). Bacteriophages from the forestomachs of Australian Marsupials. Applied and environmental microbiology, p: 3660-3663.
- Krause, D., J. B. Russell. (1996). How many ruminal bacteria are there? J. Dairy Sci. 79:1467-1475.
- Kumar, U., V. K. Sareen, S. Singh, (1997). Effect of yeast culture supplement on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. J. Sci. Food Agric., 73: 231–236.

- Kurihara, Y., J. Margaret, P. N. Hobson, S. O. Mann. (1968). Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the sheep rumen. J. gen. Microbiol, 51:267-288.
- Laaberki, M. H., J. Dworkin. (2008) .Role of Spore Coat Proteins in the Resistance of Bacillus subtilis Spores to Caenorhabditis elegans Predation. Journal of Bacteriology. Vol. 190. No. 17.
- Larue, R., Z. Yu, V. A. Parisi, A. R. Egan, M. Morrison. (2004). Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. Environmental Microbiology, submitted.
- McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, K. J. Cheng. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72:3004–3018.
- McCrady, M. V. H. (1918). Tables for rapid interpretation of fermentation-tube results. Pub. Health J. 9:201.
- McGarvey, J. A., S. W. Hamilton, E. J. DePeters, F. M. Mitloehner. (2010). Effect of dietary monensin on the bacterial population structure of dairy cattle colonic contents. Appl Microbiol Biotechnol, 85:1947–1952.
- Miron, J., D. Ben-Ghedalia, M. Morrison. (2001). Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. J. Dairy Sci. 84:1294–1309.
- Mouriño, F., R. Akkarawongsa, P. J. Weimer. (2001). Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. Journal of Dairy Science. 84: 848-859.
- Pate, J. L., J. O. Erling. (1965). The fine structure of two unusual stalked bacteria. J. Cell Biology, volume 7.
- Shi, Y., C. L. Odt, P. J. Weimer. (1997). Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate- limited conditions. Applied and Environmental Microbiology. 63: 734-742.
- Song, M. K., J. J. Kennelly. (1990). Ruminal fermentation pattern, bacterial population and ruminal degradation of feed ingredients as influenced by ruminal ammonia concentration. J Anim Sci. 68:1110-1120.
- Tajima, K., S. Arai, K. Ogata, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, R. I. Aminov, Y. Benno. (2000). Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. Anaerobe. 6: 273-284.
- Tillett, H. E. (1987). Most probable numbers of organisms: revised tables for the multiple tube method. Epidem. Inf. 99: 471-476.

- Thauer, R. K., K. Jumgermann, K. Decker. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev., 91:100–180.
- Volden, H., L. T. Mydland, O. M. Harstad. (1999). Chemical composition of protozoal and bacterial fractions isolated from ruminal contents of dairy cows fed diets differing in nitrogen supplementation. Acta Agriculturæ Scandinavica. Section A-Animal Science. 49: 235-244.
- Varga, G. A., E. S., Kolver. (1997). Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. J. Nutritional Sciences. p: 819-823.
- Weimer, P. J. (1996). Why don’t ruminal bacteria digest cellulose faster? J. Dairy Sci 79:1496-1502.
- Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, D. R. Mertens. (1999). Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 82: 122-134.
- Zoetendal, E. G., C. T. Collier, S. Koike, R. I. Mackie, H. R. Gaskins. (2004). Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. Journal of Nutrition. 134: 465-472.

فصل پنجم

پروتوزوئر های شکمبه

۵-۱ تکنیک های شناسایی پروتوزوئرها	۲۰۹
۵-۲ روش های مطالعه پروتوزوئرهای شکمبه	۲۱۲
۵-۳ طبقه بندی پروتوزوئرهای شکمبه	۲۱۶
۵-۴ فعالیت های حیاتی در پروتوزوئرها	۲۲۶
۵-۵ فعالیت های تخمیری پروتوزوئرها	۲۳۰
۵-۶ جمعیت پروتوزوئرها	۲۴۰
۵-۷ اثر متقابل پروتوزوئرها با سایر میکروارگانیسم های شکمبه	۲۴۹
۵-۸ برای مطالعه بیشتر	۲۵۰

پروتوزوئرهای شکمبه

با وجود آنکه پروتوزوئرها همانند باکتری ها و قارچ ها در زمان تولد در شکمبه دام ها حضور ندارند، اما میکروارگانیسم های حیاتی در شکمبه دام های بالغ محسوب می شوند. استقرار این گونه زیستی در شکمبه بیشتر براساس تماس با دام های بالغ تر (از طریق لیسیدن و حتی تنفس؛ مژک داران فقط با این روش انتقال می یابند) و سپس خوراک مصرفی (بیشتر براساس ریخته شدن بزاق روی آنها) می باشد. کارشناسان استقرار دائمی پروتوزوئرها را در شکمبه از سن ۵ تا ۹ هفتگی از روز تولد دانسته و علت این تاخیر را می توان شرایط اسیدی شکمبه به دلیل تخمیر اسید لاکتیک در اثر ورود مواد مغذی به شکمبه دانست. در نگاه اولیه می توان گفت با غیبت این تک سلولی ها میزان ترن آور پروتئین ها و سلامت محیط شکمبه کاهش می یابد. اما در نگاه عمیق تر پروتوزوئرها یک موجود انگلی و شکارگر باکتری می باشند، که در غیاب آنها تجزیه پذیری بعضی از مواد مغذی افزایش می یابد. پروتوزوئرها اولین بار در اواسط قرن نوزدهم مشاهده و مورد توجه قرار گرفتند. این گروه از میکروارگانیسم ها دارای مژک (*Ciliate*) و یا تاژک (*Flagellate*) بوده و از مشخصه های دیگر آنها جثه بزرگ و بی هوازی بودن آنها می باشد. در حالت عادی تعداد مژک داران بر تاژک داران غالب می باشد. تعداد پروتوزوئرها در شکمبه معمولا براساس خوراک استاندارد (۴۰ درصد علوفه و ۶۰ درصد مواد متراکم) و شمارش مستقیم $۱۰^{۵}$ در هر میلی لیتر مایع شکمبه محاسبه می شود (به عبارت دیگر $۱۰^{۸}$ عدد در هر گرم محتویات شکمبه). این مقدار می تواند ۴۰ تا ۶۰ درصد توده زنده میکروبی را تشکیل دهد. اما از لحاظ حجمی می توان گفت که مقدار باکتری ها با پروتوزوئرها تقریبا برابر در نظر گرفته می شود. تعداد پروتوزوئرها در شکمبه تحت تاثیر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خوراک مانند ترکیب خوراک مصرفی، دفعات خوراک دهی، محلولیت مواد مغذی و خصوصیات شیمیایی شکمبه مانند اسیدیته، ظرفیت نگهداری آب، ویسکوزیته و سایر موارد می باشد.

۵–۱ تکنیک های شناسایی پروتوزوئرها

پروتوزوئر شناسی در اصل به معنای شناخت تک سلولی های اولیه می باشد که به دو گروه جانوری و گیاهی تقسیم می شوند. پروتوزوئرها جانداران یوکاریوتیک تک سلولی هستند، که به قلمرو آغازیان تعلق دارند. پروتوزوئرها از نظر ساختمان تفاوت بسیاری با یکدیگر داشته و این دسته از جانداران ساکن آب و خاک می باشند. عده‌ای از آنها بخشی از فلور طبیعی بدن جانداران بخصوص دسته نشخوارکنندگان را تشکیل می‌دهند. محققین گروه جانوری پروتوزوئر را به دو بخش بیماری زا و غیر بیماری زا طبقه بندی می کنند که در شکمبه نوع غیر بیماری زای آن مشهود و کاملا بی هوازی می

باشد. نام پروتوزوئر اولین بار در سال ۱۸۲۰ میلادی توسط گلدفوس بیان گردید. براساس مدارک علمی می توان پروتوزوئرها را در کنار جانوران و گیاهان یک شاخه مستقل در نظر گرفت. معمولا شناسایی پروتوزوئرها براساس خاصیت ریخت شناسی سلولی (مانند جایگاه قرار گیری مژک یا تاژک) و سپس تکنیک های ملکول زیستی (مانند درخت فیلوژنی) صورت می گیرد. اما شیوه های مانند میزان پراکنش جمعیت و فعالیت های زیستی هم می تواند در شناسایی پروتوزوئرها مهم تلقی شوند. این تک سلولی ها آنقدر بزرگ هستند که بتوان بسیاری از اجزای سلولی آنها را با یک بزرگ نمایی ساده میکروسکوپی تشخیص داد. در هنگام تشخیص پروتوزوئرها به خصوص تاژک داران می بایست دقت لازم صورت گیرد تا به صورت اشتباه با زئوسپور قارچ ها یکسان قلمداد نگردد.

براساس تکنیک های تشخیصی، محققین ساختار تشکیلاتی پروتوزوئرها را به سه قسمت مشخص و اصلی تقسیم می کنند. (۱) غشاء یا پوست (*Pellicle*)؛ که دارای خاصیت نیمه تراوا با خاصیت نیمه انتخابی همراه با فعالیت های فاگوسیتوز و پینوسیتوز می باشد. زوائد دهان مانند در حد یک حفره (به شکل ستاره ایی، مدور و شیاری)، ضمائم حرکتی و مقعد در آنها قابل شناسایی است. (۲) سیتوپلاسم که به دو بخش خارجی (اکتوپلاسم) و داخلی (آندوپلاسم) تقسیم می شود. بخش داخلی؛ دارای ضمائم داخلی مانند واکوئل های گوارشی و انقباضی (ضربان دار) و سایر اندامک های سلولی می باشد. واکوئل گوارشی در انتهای مجرای گوارشی قیف مانندی که به دهان متصل است، قرار دارد و سبب هضم مواد غذایی بلعیده شده می شود. واکوئل ضربان دار مسئول تنظیم فشار اسمزی و دفع مواد زائد سلولی را از طریق خروجی های پوست عهده دار است. واکوئل های انقباضی معمولا در پروتوزوئرهای آب شیرین که سیتوپلاسم آنها نسبت به محیط آبی اطراف هیپرتونیک است، دیده می‌شود. البته در بعضی از گونه‌های دریایی نیز هم مشاهده شده است. این واکوئل ها همراه با جریان سیتوپلاسمی (سیلکوز) در داخل سیتوپلاسم جابجا می‌شوند. در پروتوزوئرهای گیاهی موجود در شکمبه که بواسط مصرف خوراک وارد مخزن تخمیر شده اند اختصاصاتی مانند وجود یک یا چند اندامک محتوی کلروفیل و کاروتنوئید به نام کروماتوفور مشاهده می گردد. این اندامکها در تغذیه هولوفیتیک دخالت دارند و به همین دلیل تاژک داران گیاهی را جز جلبک های سبز به شمار می‌آورند. پروتوزوئر حاوی کروماتورفور معمولا دارای یک لکه چشمی به نام استیگما هستند که بخشی فنجانی شکل و حاوی رنگدانه های کاروتنوئیدی است و به رنگهای سرخ و قهوه‌ای دیده می‌شود. بخش خارجی؛ شفاف، گاهی با ضمائم و بدون ضمائم که مسئول حرکت، جذب و ترشح سلولی را به عهده دارد، مشاهده می شود. و (۳) هسته که دارای غشاء، شیره مخصوص بنام کاریولنف، کروموزوم و هستک (کاریوزوم) می باشد. بعضی از پروتوزوئرها دارای بیش از یک هسته (یک هسته بزرگ و گاه تا ۸۰ هسته کوچک) و

مانند مژک داران دارای دوتا هسته کنار هم می باشند. با این ترتیب می توان گفت پروتوزوئرها شکل ساده زندگی حیوانی می باشد که دارای اشتراکات بالایی با حیوانات دارد.

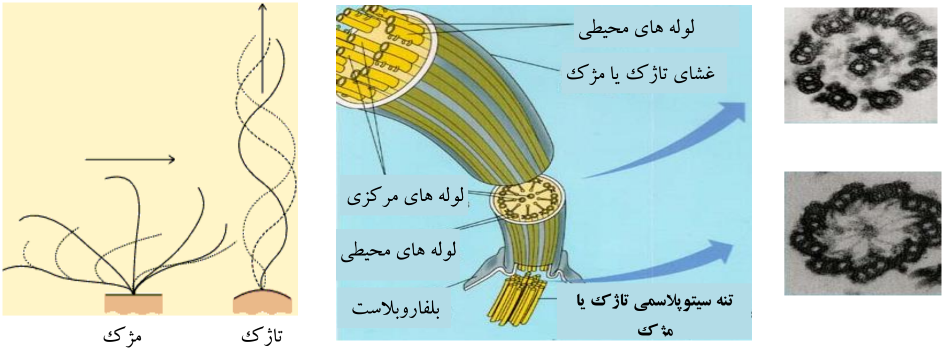
اندازه پروتوزوئرهای شکمبه به شدت متغیر و تقریبا طول آنها از ۱۵ تا ۲۵۰ میکرومتر و عرضشان ۱۰ تا ۲۰۰ میکرومتر محاسبه شده است. البته دسته ای از پروتوزوئرها در طبیعت زندگی می کنند که دارای طولی به بیش از ۵ میلی متر در بورساریا و ۱۰ میلی متر در گرگارین ها و پورسپوراژیگانته آ می باشد. شکل این تک سلولی ها متغیر و می توان گفت شکل ثابتی هم ندارند (شکل ۱-۵). به همین دلیل تقارن در پروتوزوئرها به ندرت دیده می شود. البته در بعضی از گونه های آن به دلیل وجود پوست ضخیم اشکال تقریبا ثابت تر دیده می شوند. در بعضی از پروتوزوئرها مانند گروهی از تاژک داران مانند سارکودینا علاوه بر پوست ضخیم، تارهای اسکلت مانندی به نام فیبریل مشاهده می شود که شکل پروتوزوئر را ثابت تر نگاه می دارد.

شکل ۱-۵ اشکال متفاوت پروتوزوئرهای شکمبه (تاژک داران و مژک داران).

در بعضی از پروتوزوئرها پای کاذب دیده می شود که همانند تاژک و مژک از عوامل حرکتی محسوب می گردد. با ایجاد پای کاذب تمامی محتویات سلول وارد آن شده و پروتوزوئر کم کم جابجا می شود. اما در گروه تاژک داران، تاژک ها اصلی ترین ضمائم دیواره سلولی جهت حرکت محسوب می شوند. تعداد تاژک ها در این تک سلولی ها متغیر و بین ۱ تا ۱۰۰ عدد قابل تغییر است. هر تاژک از بخش کوچکی به نام بلفاروبلاست که در سیتوپلاسم سلول قرار دارد، خارج می شود. در حالت عادی تاژک دارای حرکت دورانی می باشد و در هر ثانیه بین ۱۰ تا ۴۰ بار مرتعش می گردد. در پروتوزوئرهایی که یک تاژک دارند علاوه بر حرکت دورانی، یک حرکت موجی نیز دیده می شود که می تواند سبب چرخش پروتوزوئر به دور خود در حین حرکت شود. افزایش در تعداد تاژک سبب

حرکت یکنواخت تر پروتوزوئر می شود. لازم به ذکر است هر تاژک دارای یک غشاء پوستی همراه با سیتوپلاسمی است که یازده رشته لوله بزرگ به نام فیبریل یا میکروتوبول را محصور نموده است (شکل ۱-۵). لوله ها در مرکز دو رشته و در محیط تاژک ۹ رشته جفت بزرگ و کوچک می باشد.

در گروه مژک داران، مژک ها عامل حرکت محسوب می شوند. تعدا مژک ها متفاوت و گاهی به هزار یا ده هزار عدد هم می رسد. مژک ها دارای حرکت پاروئی شکل و سریعی هستند و با خم شدن به یک طرف و راست شدن دوباره سبب حرکت پروتوزوئر می شوند. حرکت مژک ها و تاژک ها به میزان ATP و یون کلسیم داخل سلول وابسته می باشد. ساختمان مژک همانند تاژک بوده (شکل ۲-۵) و منشاء آنها کنیتوبلاست می باشد. مژک داران علاوه بر مژک دارای حرکت انقباضی سریع بوده که توسط تارهای میون همانند یک عضله آغاز می گردد. در نهایت حرکت پروتوزوئر با هر وسیله ای را محققین تاکتیسم می نامند، که می تواند مثبت (در جهت موافق پروتوزوئر مانند رسیدن به ماده غذایی) و یا منفی (در جهت مخالف پروتوزوئر مانند فرار از دشمن) عنوان شود.



شکل ۲-۵ ساختار تاژک و مژک در پروتوزوئرها و نحوه حرکت در آنها.

۲-۵ روش های مطالعه پروتوزوئرهای شکمبه

جهت بررسی و مطالعه پروتوزوئرهای شکمبه لازم است پراکنش و شکل آنها تعیین و رسیدگی های مربوط به آن صورت گیرد. تعیین هویت پروتوزوئرها به دلیل گستردگی و تا حدی پیچیدگی های زندگی (بطور مثال؛ سلول دیپلودینیا دنتاتوم که دارای شش زائده می باشد، نتاج آن فاقد زائده بوده یا دارای یک یا دو زائده می باشد) مشکل و تقریبا شناسایی همه آنها در حال حاضر غیر ممکن به نظر می رسند. علت مجهول بودن هویت اکثر پروتوزئرها فقدان کشت کامل آنها به دلیل هزینه های بالا و روش کار سخت عنوان می شود. با همه سخت بودن روش تعیین هویت، کارشناسان روش های زیادی در این زمینه براساس امکانات آزمایشگاهی ارائه داده اند. اما برای یکسان سازی و مطلوب تر شدن مطالعات پروتوزوئر شناسی لازم است یک روش ساده و در عین حال با دقت بالا مشخص و همه پژوهشگران از

آن استفاده نمایند. با بکارگیری تکنیک های یکسان می توان قیاس های واقعی بین پژوهش های مختلف انجام داد.

۵-۲-۱ کشت پروتوزوئرها

تولید کشت همچنان یکی از مباحث اصلی و در حال تغییر در مطالعات پروتوزوئر شناسی می باشد. محققین ثابت نموده اند که بخش عمده ای از نیازهای غذایی گونه های پروتوزوئری مانند ترکیبات پروتئینی به وسیله باکتری های شکمبه تامین می گردد. لذا عدم استفاده از باکتری ها در کشت های مزبور سبب کاهش و یا فقدان رشد دسته ای از پروتوزوئرها در محیط مورد نظر می شود. بطور مثال؛ گونه های وابسته به هلوتریش ها به باکتری وابستگی عمیقی نداشته (هلوتریش ها می توانند بر روی کشت های حاوی یونجه آسیاب شده، آرد، نشاسته، برنج و مایع شکمبه بدون پروتوزوئر رشد کنند) و بالعکس گونه های راسته انتودینوموفیداها یا س حال کشت را با باکتری یا مواد مغذی مورد نیاز مشخص و سپس اقدام به کشت پروتوزوئر نمود. نتایج نشان داده است که پروتوزوئرها از باکتری ها به عنوان منبع غذایی برای رشد استفاده می نمایند و این عمل را هم به صورت اختصاصی انجام می دهند. بدون حضور باکتری کشت های پروتوزوئری مانند کشت گونه های انتودینیومی، دیپلودینیومی و یا گونه داسی تریشیا رومینانتیوم حداکثر تا ۹۶ ساعت زنده می مانند. گونه های پروتوزوئری قادر به ساخت اسیدهای آمینه از کربوهیدرات و آمونیاک موجود در شکمبه نیستند و اسیدهای آمینه مورد نیاز خود را از تجزیه باکتری های بلعیده شده زنده تامین می کنند. نیاز به زنده بودن باکتری ها در کشت های پروتوزوئری هنوز مبحث سئوال برانگیزی است که به صورت کامل بررسی نشده است.

پروتوزوئرها همانند باکتری ها دارای دو نوع محیط کشت ساده یا نوتوبیوتیک (برای یک گونه خاص جهت شناسایی فرآیندهای بیوشیمیایی) و مخلوط (برای شناسایی ریخت شناسی و جمعیتی کلیه پروتوزوئرها در سیستم های مشابه با شکمبه) می باشند. محیط های کشت تولید شده اگر براساس مواد شیمیایی حاصل شوند، پروتوزوئرها قادر به تکثیر و رشد در آن نمی باشند. اما در هر صورتی محققین تنها کشت های مایع (Broth) را در نگهداری، تکثیر و رشد پروتوزوئرها موثر می دانند. کشت های پروتوزوئری همواره برای یک دوره زمانی کوتاه (حداکثر تا ۶۰ روز) تهیه می شوند. در تهیه کشت های پروتوزوئری کارشناسان علاوه بر باکتری های و کشت های پایه که به شکل انتخابی، افتراقی، غنی کننده و کامل دیده می شود اقدام به مصرف مایع صاف شده شکمبه، علوفه خرد شده (در دمای ۵۵ درجه در آون خشک و آسیاب می شود) و سایر مواد مغذی مانند ویتامین ها (به خصوص نیاسین) و اسیدهای چرب فرار می نمایند. کشت پایه برای نگهداری هلوتریش ها بدین شکل تهیه می شود: ابتدا

محلول های (براساس درصد) $NaCl$ = ۰/۵، CH_3CO_2Na = ۰/۱۵، K_2HPO_4 = ۰/۱، ۰/۰۳ = KH_2PO_4، ۰/۰۱ = $CaCl_2.6H_2O$، ۰/۰۱ = $MgSO_4.7H_2O$ و ۱۰۰ میلی لیتر مایع صاف شده شکمبه (که به مدت ۳۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شده است) را با هم آمیخته و سپس محلول تولید شده را در فشار ۱۵ اتمسفر به مدت زمان ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو می کنیم. محلول اتوکلاو شده را در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد قرار داده تا دمای آن سردتر و به دمای مطلوب برسد. آنگاه محلول تولید شده را در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۵ دقیقه گاز (مخلوطی از ۹۵ درصد نیتروژن و ۵ درصد دی اکسیدکربن) می دهند. بعد از این فرآیند می توان کشت پایه را به الیاف سلولزی استریل شده و باکتری های شکمبه آغشته و محیط را برای رشد پروتوزوئرهای سلولایتیکی آماده نمود. فقدان مصرف مایع شکمبه در کشت پایه سبب مرگ پروتوزوئرهای کشت شده پس از ۱۰ روز می شود. مایع گرفته شده از شکمبه جهت تولید کشت پایه می بایست اتوکلاو گردد تا پروتوزوئرهای احتمالی آن حذف شوند. بعد از اتوکلاو برای از بین رفتن میکروارگانیسم های احتمالی می توان از Nalidixic acid و Streptomycin استفاده نمود. اگر چه کشت پایه برای الیگوتریش ها همانند روش فوق تولید می گردد. اما دارای تفاوت های اساسی در مقدار عناصر سازنده می باشد که به شرح ذیل صورت می گیرد:

ابتدا محلول های (براساس گرم در لیتر) $NaCl$ = ۳/۰، ۱/۰۸ = سدیم استات سه آب، ۰/۵ = K_2HPO_4، ۱/۰ = KH_2PO_4، ۰/۰۰۸ = $CaCl_2$، ۰/۱ = $MgSO_4.7H_2O$ و ۱۰۰ میلی لیتر مایع صاف شده شکمبه (که به مدت ۳۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شده است) را با هم آمیخته و سپس محلول تولید شده را در فشار ۱۵ اتمسفر به مدت زمان ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو می کنیم. قبل از مصرف کشت پایه لازم است ۱/۰ = $NaHCO_3$ و ۰/۱ = $Na_2S.9H_2O$ یا یک گرم سیستئین-اسیدکلریدریک را به آن اضافه نماییم. برای به حجم رساندن کشت های پایه در الیگو تریش ها و هلوتریش ها می توان از سدیم سولفات یک درصد استریل شده استفاده نمود. اسیدیته مطلوب کشت پایه بین ۷-۶/۵ = pH می باشد که برای تنظیم آن می توان از بافر ۰/۰۵ درصد استفاده کرد. دی اکسیدکربن مصرفی به عنوان گاز سبب بی هوازی شدن محیط کشت تولیدی همانند محیط شکمبه می شود. عده ای از محققین علاوه بر کشت پایه، کشت های تولید شده ایی از آگار، گلوکز، نشاسته و عصاره مخمر در مطالعه پروتوزوئرها استفاده نموده اند.

۵-۲-۲ شمارش پروتوزوئرها

می توان گفت برای شمارش دقیق پروتوزوئرهای شکمبه می توان همانند شمارش باکتری ها عمل نمود. از آنجا که نوع و نحوه نمونه برداری همراه با کنترل اسیدیته نمونه حمل شده به آزمایشگاه از اهمیت بالایی برخوردار است، لازم است دقت فراوانی در این زمینه صورت گیرد. برای گرفتن نمونه مایع شکمبه می توان از طریق فیستولا اقدام و توسط گاز پزشکی صاف می نماییم. پس از صاف کردن و براساس ته نشینی می توان اقدام به جداسازی گونه های مختلف پروتوزوئری نمود. آنگاه، اولین فعالیت انجام گرفته در شمارش پروتوزوئرها بعد از نمونه گیری رقیق سازی محتویات شکمبه می باشد. روش رقیق سازی نمونه هایی که برای شمارش پروتوزوئرها بکار می رود، همان روشی است که در مبحث باکتری شناسی ارائه گردیده است. برای شمارش پروتوزوئرهای شکمبه لازم است محتویات شکمبه ثابت یا محافظت گردد. برای این منظور مقداری از محتویات شکمبه را به اندازه همان حجم با فرمالین ۵۰ درصد یا فرمالدئید ۱۸/۵ درصد و یا گلوتارآلدئید ۲ درصد (*glutaraldehyde*) مخلوط می کنیم. سپس برای رنگ آمیزی می توان مایع محافظت شده را با رنگ سبز بریلیانت مخلوط و جهت تثبیت رنگ چهار ساعت نگهداری می نماییم. برای رقیق سازی نمونه رنگ آمیزی شده، ۹ میلی لیتر از گلیسرول ۳۰ درصد را با یک میلی لیتر مایع رنگ آمیزی شده مخلوط نموده و با این روش نمونه ای ۲۰ برابر رقیق تر از مایع شکمبه خواهیم ساخت. گلیسرول مصرف شده در جهت رقت سازی سبب افزایش زمان ته نشینی پروتوزوئرها می شود. بعد از آماده شدن نمونه یک میلی لیتر از مایع مزبور را در لام های شمارشگر هموسیتومتر ریخته و با میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۱۰ برابر شمارش می کنیم. برای سهولت شمارش لازم است هر سلول که اضلاع بالایی یا سمت چپ مربعات را لمس کند، شمرده گردد. اما خطوط پایینی و سمت راست مربعات شمارشگر را شمارش نمی کنیم. با شمارش ۵۰ مربع و با داشتن میزان رقت و حجم مربعات شمرده شده می توان غلظت کل پروتوزوئرها را در یک میلی لیتر مایع شکمبه بدست آورد. براساس همین شیوه می توان غلظت کلی پروتوزئرهای شکمبه را محاسبه نمود.

۵-۲-۳ شناسایی پروتوزوئرها

برای تشخیص شکل پروتوزوئرها، می توان ۱ تا ۲ میلی لیتر مایع شکمبه را به چند قطره متیل گرین (*Methyl green*) یا یدین یا کلر-روی-یدیک و محلول سالین فرمل دار آمیخته می کنیم. پس از نگهداری محلول آمیخته به مدت ۶ ساعت مایع مزبور را روی اسلاید همراه با آب یا گلیسیرین ۵۰ درصد قرار داده و پروتوزوئرها را مشاهده می کنیم. برای مشاهده ماکرو و میکرونوکلئوس ها می توان از محلول متیلن بلوی اسیدی که نوکلئوس را آبی پر رنگ می کند، استفاده کرد. همچنین برای شناسایی صفحات اسکلتی در پروتوزوئرها می توان از محلول ید لوگل استفاده نمود که صفحات اسکلتی را قهوه

ای رنگ می کند. اندازه های (طول و عرض) سلول پروتوزوئر را می توان با بزرگ نمایی ۴۵۰ تا ۱۰۰۰ برابر و بواسط عدسی مدرج میکروسکوپ محاسبه نمود.

۵-۳ طبقه بندی پروتوزوئرهای شکمبه

کارشناسان طبقه بندی های متفاوتی در این زمینه ارائه داده اند. مهمترین آنها برپایه خاصیت ریخت شناسی (زائده های بدنی، صفحات اسکلتی و اشکال هندسی)، اندازه و رفتار حرکتی شکل گرفته است. اما کارشناسان علاوه بر دو فاکتور اساسی فوق، رفتارهای تغذیه ایی (انگلی، شکارگران میکروبی و سایر مواد مغذی همراه با غذاسازی) و شرایط زیستی (دو گروه گیاهی و جانوری که بر معیار فتوسنتز طبقه بندی می شوند، به سه شکل مستقل، همزیست و انگلی زندگی می کنند) را هم در این طبقه بندی دخالت داده اند. امروزه کارشناسان جهت مطالعه دقیق تر پروتوزوئرها و شناسایی کامل آنها طبقه بندی های مذکور را ادغام و طبقه بندی ویژه ارائه نموده اند. پیشتر از آنکه در مورد گونه و جنس های مختلف پروتوزوآیی و نحوه طبقه بندی آنها بحث کنیم، لازم است بگوییم که تنوع پروتوزوئرها در شکمبه به شدت تابع شرایط جغرافیایی محل و تنوع جانوری - گیاهی منطقه می باشد. بطور مثال؛ میکروکتوس لاپوس (*Microcetus lappus*) فقط در دام های منطقه نروژ دیده می شود. تا به امروز محققین بیش از ۳۰ هزار گونه پروتوزوئری (بیماری زا و غیر بیماری زا) در دنیا تشخیص داده اند که می تواند هر یک از آنها با مصرف آب و گیاه هر منطقه در شکمبه دام ها مشاهده گردند. به همین دلیل کارشناسان در شناسایی پروتوزوئرهای واقعی شکمبه از پروتوزوئرهای عبوری، معیاری مشابه باکتری ها در حیات شکمبه ارائه نمودند. خصوصیات مهمی چون اسیدیته، دما، پتانسیل اکسید- احیاء و نیازهای تغذیه ایی پروتوزوئرها در محیط مخزن تخمیر از این معیارها می باشد. از طرف دیگر جداسازی مکرر یک پروتوزوئر از شکمبه در نقاط مختلف جغرافیایی و سپس محل آزمایش هم می تواند دلیل مناسبی برای حضور مسلم پروتوزوئر در شکمبه دانست.

۵-۳-۱ طبقه بندی پروتوزوئرها براساس رفتار حرکتی

کارشناسان پروتوزوئرها را براساس رفتارهای حرکتی به پنج بخش عمده تقسیم می کنند. گروه ها شامل (۱) تاژک داران (*Flagella*) یا ماستیگوفورا (*Mastigophora*)، (۲) مژک داران (*Ciliates*) یا سیلیاتا (*Ciliata*)، (۳) اسپوروزوآ (*Sporozoa*)، (۴) ریشه پایان (*Rhizopods*) یا سارکودینا (*Sarcodina*) و (۵) سوکتوریا (*Suctoria*) یا مکنده ها می باشند.

۵-۳-۱-۱ تاژک داران یا ماستیگوفورآ

اگر چه بعضی از از تاژک داران می توانند پای کاذب برای حرکت ایجاد نمایند، اما وسیله اصلی حرکت آنها، چند تاژک است . بعضی از پروتوزوئرهای بسیار ابتدایی در این زیر شاخه قرار می گیرند. گروه تاژک داران شامل فیتوفلاژله ها (رده فیتوماستیگوفورآ) با یک ی دو (گاهی چهار) تاژک که معمولا کلروفیل داشته و گیاه مانند می باشند. زئوفلاژله ها (رده زئوماستیگوفورآ) که کلروفیل نداشته و هولوزوئیک یا ساپروزوئیک اند و به جانوران می مانند. تغذیه تاژک داران بر سه نوع ۱- هولوفایتیک یا فتوسنتز کننده (*Holophytic*)، ۲- ساپروفایتیک یا هضم کننده مواد آلی (*Saprophytic*) و ۳- هولوزوئیک (*Holozoic*) که مواد مغذی به خصوص باکتری ها را می بلعند، صورت می گیرد. تولید مثل در تاژک داران به صورت غیر جنسی و به دو روش تقسیم دوتایی طولی (به روش میتوز) و چند تایی (داخل یک کیست) صورت می گیرد. گاهی کارشناسان تاژک داران را براساس شرایط تغذیه و نوع گونه جانوری و گیاهی طبقه بندی می نمایند.

۵-۳-۱-۲ مژک داران یا سیلیاتا

مژک داران گروه جالب توجه و بزرگی هستند که اقسام آن از نظر شکل، گوناگونی زیاد دارند. این تک سلولی ها در زیستگاه های آب شیرین و شور به سر می برند. مژک داران از نظر ساختاری، پیچیدگی های زیادی دارند و در میان پروتوزوئرها، تخصص یافته تر از بقیه به شمار می آیند. بیشتر آنها زندگی آزاد دارند، اما اقسام انگل و هم سفره هم در میان آنها یافت می شود. منزوی، متحرک و گاه ثابت هستند و در پاره ای اوقات به صورت کلونی دیده می شوند. گوناگونی شکل و اندازه میان آنها زیاد است. در مجموع، از بقیه پروتوزوئرها درشت ترند و اندازه آنها بین ۱۰ تا ۲۰ میلی میکرون تا ۳ میلی متر دیده می شود. همه آنها مژک هایی دارند که به صورت منظم و هماهنگ موج می زنند. درضمن، آرایش مژک ها گوناگون است و برخی هم در حالت بلوغ مژک هایشان را از دست می دهند. در نهایت مژک ها کوتاه و ممکن است سطح سلول را بپوشانند، یا آنکه به ناحیه دهانی یا به نوارهای ویژه محدود شوند. در بعضی از اشکال، مژک ها به صورت ورقه جوش خورده اند که غشای «نوسان دار» نامیده می شوند. گاهی این قطعات غشای کوچکتری را تشکیل می دهند که برای راندن غذا به درون گلو (*Cytopharynx*) به کار می آیند. در شکل های دیگر ممکن است مژک های به هم جوش خورده کاکل مانندهای محکمی را تشکیل دهند که سیری (*Cirri*) نام دارد. سیری اغلب برای خزیدن به کمک مژک ها طراحی شده اند.

۵-۳-۱-۳ ریشه پایان یا سارکودینا

این گروه از پروتوزوئرها دارای پاهای کاذب (*Pseudopodia*) سیتوپلاسمی هستند. زیستگاه آنها در آبهای شیرین یا شور بوده و با خزیدن در آب حرکت می کنند. با تاژک داران ارتباط ژنتیکی دارند (تاژک داران در مرحله ای خاص از چرخه زندگی به شکل آمیب در آمده و تاژک خود را از دست می دهند) و بدون تقارن یا تقارن کروی دیده می شوند. این گروه از پروتوزوئرها بدون تشکیل هاگ و بدون عمل الحاق (*Conjugation*) زندگی می کنند. زیر شاخه سارکودینا در برگیرنده دو فوق رده بر اساس نوع پاهای کاذب می باشد که شامل ریشه پایان (*Rhizopoda*) و محور پایان (*Actinopoda*) خواهد بود. پاهای کاذب علاوه بر حرکت در مصرف مواد غذایی به صورت حلقه زندن، بلع محیطی، فرورفتگی، نوشیدنی سلولی یا پینوسیتوز، هضم و جذب وارد عمل می شوند. غذای هضم نشده هم به تدریج به طرف عقب و سمت چپ کشیده می گردد و چون منفذی وجود ندارد، با ایجاد یک دهانه موقتی براثر فرورفتگی در اکتوپلاسم آن را به خارج دفع می کند. تولید مثل در سارکودینا به دو روش غیر جنسی (به دو صورت تقسیم دوتایی و چند تایی) و جنسی صورت می گیرد. حضور این گروه از پروتوزوئرها در مقایسه با تاژک داران و مژک داران در شکمبه محدودتر می باشد.

۵-۳-۱-۴ اسپوروزوآ

رده هاگ داران دارای سه زیر رده به نام های گرگارینیا، کوکسیدیا و پیروپلاسمیا هستند. این گروه از پروتوزوئرها فاقد اندام حرکتی و واکوئلهای منقبض شونده بوده و انگل گروه های جانوری محسوب می شوند. حضور این گروه در شکمبه بسیار محدود و از طریق شرب آب ها وگیاهان آلوده صورت می گیرد. لذا در بخش تغذیه دام ها اهمیت اقتصادی ندارند.

۵-۳-۱-۵ مکنده ها یا سوکتوریا

مکنده ها در ابتدای زندگی شبیه مژک داران با همان مشخصه ها می باشند. این گروه با افزایش طول عمر مژک های خود را از دست می دهند و به جای آن اندام مکنده فعالیت خود را جهت حرکت پروتوزوئر آغاز می کنند. حضور این دسته از پروتوزوئرها در شکمبه بسیار محدود و تا حدودی نادر است.

۵-۳-۲ طبقه بندی پروتوزوئرها براساس ریخت شناسی

در این روش کارشناسان وجود و یا عدم وجود ضمائم سلولی مانند مژک و تاژک را مبنای طبقه بندی قرار دادند. از آنجا که عموم پروتوزوئرهای داخل شکمبه دارای تاژک یا مژک می باشند، می توان گفت این فاکتور ارزان ترین، ساده ترین و در عین حال مطلوب ترین روش شناسایی پروتوزوئر در شکمبه محسوب می شود. با توجه به مدارک و پژوهش های اخیر بدست آمده (براساس مشاهدات

میکروسکوپی و تعیین توالی های RNA ریبوزومی) می توان پروتوزوئرهای شکمبه را به دو شاخه سیلیوفورا و ساکروماستیگوفورا تقسیم بندی نمود.

5-3-2-1 شاخه ساکروماستیگوفورآ (*Sacromastigophora*)

پروتوزوئرهای تاژک دار موجود در شکمبه در شاخه ساکروماستیگوفورآ طبقه بندی می شوند. اگر چه تراکم این دسته از پروتوزوئرها در شکمبه محدودتر (10^{3}-10^{4} در هر میلی لیتر مایع شکمبه) از شاخه سیلیوفورا می باشد، اما به دلیل تاثیر آنها بر کربوهیدرات های محلول شکمبه (حتی به مقدار کم) و مصرف آن بر محیط شکمبه اثر بسزایی خواهند داشت. به دلیل شباهت های این گروه از پروتوزوئرها با زئوسپورهای قارچ کارشناسان به اشتباه بسیاری از یافته های خود را پروتوزوئر شاخه تاژک داران نامیدند. اساس خصوصیت مورد استفاده برای این طبقه بندی ابتدا وجود تاژک و شکل پروتوزوئر بوده است. اما خصوصیاتی مانند حضور یا عدم حضور غشای موجی شکل، ساختار اگزواستیل (*Axostyle*) یا ساختمان میکروتوبولار و شیار سیتوزومی در طبقه بندی داخلی شاخه تاژک داران مورد استفاده قرار گرفته است. بر همین اساس کارشناسان تاژک داران شکمبه را به پنج جنس تقسیم نمودند که شامل؛ مونوسرکومونوایدس (*Monocercomonoides*)، مونوسرکوموناس (*Monocercomonas*)، پنتاتریکوموناس (*Pentatricomonas*)، تتراتریکوموناس (*Tetratricomonas*) و کیلوماستیکس (*Chilomastix*)، می باشد. سایر جنس های تعیین شده در مقالات پیشین زیر مجموعه زئوسپورها (قارچ ها) طبقه بندی می گردند. جنس های نام برده شده در دو زیر شاخه متاماستیگوفورآ (*Metamastigophora*) و پاراباسالا (*Parabasala*) قرار دارند. زیر شاخه متاماستیگوفورآ دارای دو رده رتورتامونادآ (*Retortamonadea*) با یک جنس کیلوماستیکس (دارای شیار سیتوزومی، بدون غشاء و ساختار اگزواستیل) و اکسی مونادآ (*Oxymonadea*) با یک جنس مونوسرکومونوایدس (بدون غشاء و دارای ساختار اگزواستیل) می باشد. زیر شاخه پاراباسالا دارای یک رده تریکومونادآ (*Trichomonadea*) با سه جنس باقیمانده و دارای غشاء و ساختار اگزواستیل خواهد بود. همچنین، محققین هفت گونه از تاژک داران را در زیر مجموعه پنج جنس طبقه بندی نموده اند که شامل مونوسرکوموناس رومینانتیوم (*M. ruminantium*)، مونوسرکوموایدس کاپرا (*M. caprae*)، مونوسرکوموایدس بوویس (*M. bovis*)، کیلوماستیکس کاپرا (*C. caprae*)، تتراتریکوموناس بوتری (*T. buttreyi*)، پنتاتریکوموناس هومینیس (*P. hominis*) و تریکوموناس رومینانتیوم (*T. ruminantium*) می باشد. کارشناسان همه تاژک داران موجود در شکمبه را در زیر گروه زئوماستیگوفورآ (*Zoomastigophora*) قرار می دهند. این تاژکداران دارای جمعیت کم و اندازه کوچک ۴ تا ۱۵ میکرومتری بوده و اشکال بدنی آنها عمدتا بیضوی شکل و ۳ تا ۵ تاژک در انتهای

بالایی بدن آنها دیده می شود. البته در بعضی گونه ها مانند هومینیس تاژک پایینی هم مشاهده می گردد. درباره گروه تاژک داران اطلاعات کمی وجود داشته و کارشناسان درباره شکار و هضم باکتری توسط آنها اتفاق نظر ندارند. البته در بعضی گونه های تاژک داران شکارگری باکتری نیز دیده شده است.

۲-۲-۳-۵ شاخه سیلیوفورا

بیشترین تعداد پروتوزوئرها در شاخه مژک داران (۱۰^۸-۱۰^۵ در هر میلی لیتر مایع شکمبه) قرار گرفته است. به زبان ساده می توان گفت نیمی از توده سلولی میکروب های شکمبه را مژک داران تشکیل می دهند. اولین بار در سال ۱۸۴۳ محققین پی به پروتوزوئرهای مژک دار بردند. مشخصات عمومی مژک داران شامل (۱) بدنی پوشیده از مژک که تقسیم کار محدود دارند. (۲) سیتوپلاسم آنها دارای دو نوع هسته (یکی بزرگ؛ رویشی چند n کروموزومی (نوع ماکرو) و دیگری کوچک؛ زایشی 2n کروموزومی (نوع میکرو)) است. (۳) دارای دهلیز دهانی، دهان، حلق و واکوئل های گوارشی می باشند. (۴) تولید مثل در آنها به هر دو روش غیر جنسی و جنسی (الحاق و خود باروری) صورت می گیرد. (۵) بیشتر مژک داران هولوزوئیک (تغذیه به سبک جانوران آلی) بوده و اغلب این جانداران یک دهان (*Cytostome*) مجزا دارند که در بعضی یک دهانه و در بعضی دیگر به گلو یا شیاری مژک دار مشابه است. دهان در بعضی توسط خارهایی برای بلعیدن شکارهای بزرگ تقویت شده است و در برخی مانند پارامسی ذرات غذایی را از طریق به جریان در آوردن آب توسط مژک ها، به سوی دهان می راند.

مژک داران شکمبه در شاخه سیلیوفورا قرار می گیرند. نحوه طبقه بندی ارائه شده در این شاخه متنوع و گسترده می باشد. اما در طبقه بندی ارائه شده در این مبحث مورد توافق بیشتر محققین قرار گرفته است. زیرا معیارهای طبقه بندی به نسبت مشخص تر و ثابت شده تر می باشد. بعد از شاخه سیلیوفورا کارشناسان زیر شاخه رابدوفورا (*Rabdophorea*) را تعیین و سپس رده لیتوستوماتیا (*Litostomatia*)، زیر رده تریکواستوماتیا (*Treichostomatia*) و دو راسته وستیبولیفریدا (*Vestiboliphrida*) و انتودینیومورفیدا (*Entodiniomorphida*) را اعلام نمودند. آنگاه عده ای از محققین زیر راسته هلوتریشا (*Holotricha*) یا اسپیروتریش ها را برای راسته وستیبولیفریدا با چهار خانواده ایزوتریشیدا (*Isotrichidae*)، پاراایزوتریشیدا (*Paraisotrichidae*)، بلفاروکوریتیدا (*Blepharocorythidae*) و بوشلیدا (*Buetschliidae*) بیان نمودند. از طرفی برای راسته انتودینیومورفیدا یا الیگوتریش ها سه خانواده انتودینیدا (*Entodinida*)، سیکلوپوستیدا (*Cycloposthidae*) و افریواسکولسیدا (*Ophryoscolsida*) در نظر گرفته می شود، که در خانواده افریواسکولسیدا پنج زیر خانواده طبقه بندی شده است.

گروهی از محققین خانواده انتودینیدا را زیر خانواده افریواسکولسیدا معرفی می نمایند که در این زمینه اختلاف نظر فراوانی دیده می شود. اما در جدیدترین طبقه بندی توسط گرین انتودینیدا خود یک خانواده در راسته انتودینیومورفیدا محسوب شده است. ادامه طبقه بندی ها براساس جنس و گونه که در زیر مجموعه خانواده و زیر خانواده قرار می گیرند، همچنان در حال تغییر و بین محققین اتفاق نظرهای کاملی وجود ندارد. علت آن هم یک دست نبودن معیار تشخیص جنس و گونه مژک داران در بین کارشناسان است. بطور مثال؛ بعضی از افراد اندازه بدن، پیچیدگی زائده های خلفی و اندازه و تعداد صفحات اسکلتی را معیار تقسیم بندی قرار می دهند که به عقیده عده ای از پژوهشگران عملی نمی باشد. زیرا تغییرات زیادی در زائده های خلفی و اندازه بدن در کشت های مژک داران مشاهده می شود. یا عده ای دیگر محل قرارگیری مژک را معیار طبقه بندی قرار می دهند که می تواند تا حدودی مناسب تر جلوه نماید، اما این معیار هم در عمل خالی از ایراد نیست.

- **ایزوتریشیدا؛**

این دسته از مژک داران دارای بدنی بیضوی شکل با بدنی پوشیده از مژک های موازی در محور طولی بدن می باشد. بدن این گروه از مژک داران شفاف و پس از جذب کربوهیدارت و ذخیره آن در بدن تیره رنگ می شوند. با افزایش قند یا کربوهیدرات های محلول تراکم ایزوتریشیداها بیشتر می شود. مهمترین جنس های شناخته شده در این بخش ایزوتریشیا (*Isotrichia*)، داسی تریشیا (*Dasytrichia*) و اولیگوایزوتریشیا (*Oligoisotrichia*) می باشد. اما عده ای از محققین جنس دیگری به نام میکروکتوس (*Microcetus*) معرفی کرده اند که در سابق زیر مجموعه ایزوتریشیا و داسی تریشیا قرار می گرفتند. آزمایشات نشان داده است که جنس های غالب شکمبه در اکثر دام ها از دسته ایزوتریشیا و داسی تریشیا است. وجه اصلی تمایز ایزوها از داسی ها در تریشیاها قرار گیری نوع مژک فنری یا صاف در محور طولی بدن می باشد. بدین صورت که در داسی ها مژک ها به صورت فنری مشاهده می شوند. اما شباهت اصلی ایزوها و داسی ها در تریشیاها داشتن اندوپلاسم گرانولی است و هسته در آنها به راحتی قابل مشاهده خواهد بود. در حالیکه اولیگوایزوتریشیا (با اندازه کوچک ۲۵×۱۰ میکرومتر) فاقد مژک در بخش یک ششم انتهای بدن هستند. دو گونه عمده ای که در شکمبه دام ها از گروه ایزوتریشیا یافت می شود و اهمیت خاصی دارند، ایزوتریشیا اینتستینالیس (*I. intestinalis*) و ایزوتریشیا پروستوما (*I. prostoma*) می باشد. به طور تقریبی طول و عرض اندازه بدن اینتستینالیس (۲۰۰–۹۰) × (۱۵۰–۴۵) میکرومتر (دارای هسته سه گوش در وسط سلول) و پروستوما (۲۰۰–۸۰) × (۱۲۰–۵۰) میکرومتر (تخم مرغی شکل، پخش و پهن و دارای هسته بزرگ کلیه شکل) خواهد بود. اصلی ترین خصوصیاتی که سبب تمایز این دو گونه از هم شده وستیبلوم (*Vestibulum*) یا دهان است که در اینتستینالیس در کنار

سلول و در میانه وسط تا انتها قرار دارد. در حالیکه در پروستوما در انتهای سلول و در جهت حرکت سلول واقع شده است. اما هر دو گونه دارای هسته بزرگ و کوچک در غشای سلولی بوده و توسط فیبریل ها نگهداری می شود. اندازه گونه های ایزوتریشیا می تواند بین ۴۰ تا ۲۰۰ میکرومتر متغیر باشد. دو گونه مهم دیگری که در گروه داسی تریشیا در شکمبه قابل رویت است، داسی تریشیا رومینانتیوم (*D. ruminantium*) و داسی تریشیا هوکوکانسیس (*D. hococansis*) می باشد. اندازه داسی تریشیا کمی کوچکتر از ایزوتریشیدا می باشد و اندازه طول و عرض داسی تریشیا رومینانتیوم بین (۱۰۰–۴۰) × (۵۸–۲۷) میکرومتر متفاوت می باشد. اما بزرگترین داسی تریشیا شناخته شده هوکوکانسیس می باشد، که بین متغیر (۱۸۲–۱۲۰) × (۱۲۲–۶۸) میکرومتر است. شکل عمومی داسی ها بیضوی و پهن می باشد. هوکوکانسیس دارای دهانه در کنار و میانه سلول بوده و فاقد بخش معلق هسته ایی (نسبتا ثابت و کم تحرک) همانند اولیگوایزوتریشیا است. در حالیکه گونه رومینانتیوم دارای دهانه ورودی در انتهای سلول می باشد.

جنس میکروکتوس پروتوزوئری تخم مرغی شکل، کشیده و مسطح می باشد که دارای یک گونه شناخته شده به نام میکروکتوس لاپوس (*Mi. lappus*) است. حفره دهانی و زائده های آن در گونه لاپوس در راس سلول قرار گرفته و می توان گفت کوچکترین گونه پروتوزوئری شناخته شده می باشد. اندازه گونه میکروکتوس لاپوس متغیر و طول آن (۲۸/۸–۱۸/۴) میکرومتر و عرض آن (۱۸/۱–۷/۳) میکرومتر خواهد بود. تراکم مژک در این گونه کم و تنک بوده و تقریبا ۹۰ درصد سلول آن صاف مشاهده می شود. هسته بزرگ در جنس میکروکتوس کروی تا تخم مرغی شکل همراه با واکوئل های ضربان دار می باشد. اگر چه گستردگی این جنس و گونه پروتوزوئری در شکمبه دام ها محدود است اما در بین دام های منطقه نروژ به وفور دیده می شود. تحقیقات در این زمینه همچنان ادامه دارد.

- **پاراایزوتریشیدا؛**

وجود این گونه در شکمبه نادر و به دلیل تراکم بسیار کم بندرت در معرض دید میکروسکوپی قرار می گیرد. تنها جنس شناخته شده در این خانواده، پاراایزوتریشیا می باشد که دارای یک گونه به نام پاراایزوتریشیا مینوتا (*Paraisotrichia minuta*) است. این گونه و جنس در دام های نواحی استوایی و آمریکای جنوبی مانند برزیل قابل مشاهده می باشد.

- **بلفاروکوریتیدا؛**

جنس ها و گونه های قرار گرفته در این خانواده به کاهش تراکم مژک در سطح بدن و یا عدم حضور مژک در بیشتر بخش های بدن مشاهده می شوند. در سابق محققین خانواده بلفاروکوریتیدا را در زیر راسته بلفاروکورتینا و راسته انتودینیو مورفیدا قلمداد می کردند. اما امروزه با کمک تعیین توالی

RNA ریبوزومی این خانواده را زیر مجموعه هولوتریش ها عنوان می نمایند. مهمترین جنس شناخته شده در این خانواده چارونینا (*Charonina*) می باشد که دارای دو گونه معروف به نام های چارونینا ونتریکولی (*Ch. ventriculi*) و چارونینا اکوئی (*Ch. equi*) می باشد. گونه های چارونینا نسبتا کوچکتر از سایر هلوتریش ها بجز الیگوایزوتریشیا بوده و اندازه آنها بین ۲۰ تا ۴۰ میکرومتر متغیر است. تراکم حضور خانواده بلفاروکوریتیدا در مقایسه با ایزوتریشیدا ها و بوشلیدا ها کمتر می باشد. تراکم آنها تقریبا در دام های آسیایی چشمگیر تر می باشد.

- **بوشلیدا؛**

اندازه پروتوزوئرهای خانواده بوشیلدا کوچک و بین ۳۰ تا ۷۰ میکرومتر متغیر می باشد. این خانواده بیشتر دارای یک حفره دهانی گرد در انتهای محدب بدن با یک شکل چند گوش هستند. هسته در آنها بزرگ و نمایی شبیه کلیه دارد. ردیف های مژک در اطراف محور طولی و تا انتهای پشتی کشیده شده است. کارشناسان خانواده بوشلیدا را ۵ جنس معرفی نمودند که شامل؛ بوشلیا (*Buetchlia*)، بلفاروپروستیوم (*Blepharoproshium*)، بلفاروکونوس (*Blepharoconus*)، پلی مورفلا (*Polymorphella*) و پارابوندلیا (*Parabundleia*) می باشد. اگر چه تنوع گونه در خانواده بوشلیدا زیاد مشاهده می شود، اما این تنوع به موقعیت جغرافیایی وابسته بوده و گونه ثابت در شکمبه کمتر به چشم می خورد. مهمترین گونه در جنس بوشلیا، بوشلیا پاروا (*B. paroa*) و بوشلیا تریسیلیاتا (*B. triciliata*) می باشد که به صورت پراکنده و با غلظت کم مشاهده می شوند. این گونه شباهت زیادی با داسی تریشا ها داشته و گاه اشتباه گرفته می شود. همچنین، شاخص ترین گونه در جنس بلفاروپروستیوم، بلفاروپروستیوم پارووم (*B. parvum*) و در جنس بلفاروکونوس گونه بلفاروکونوس کروجرنسیس (*B. krugerensis*) می باشد. گونه شناخته شده در جنس پلی مورفلا، پلی مورفلا بوویس (*P. bovis*) و در جنس پارابوندلیا، گونه پارابوندلیا رومینانتیوم (*P. ruminantium*) است که در دام های نزدیک خط استوا مشاهده می گردد.

- **انتودینیدا؛**

کارشناسان خانواده انتودینیدا را که در راسته انتودینومورفیدا قرار دارد، به دو جنس مهم به نام انتودینیوم (*Entodinium*) و پارانتودینیوم (*Paraentodinium*) تقسیم نمودند، که جنس انتودینیوم در این خانواده عمومیت بیشتری در بین دام ها دارد. لازم به ذکر است که در طبقه بندی پارانتودینیوم اتفاق نظر وجود ندارد. خانواده انتودینیدا ساده ترین پروتوزوئر در راسته انتودینومورفیدا می باشد. این خانواده علاوه بر واکوئل ضربان دار، دارای یک ناحیه مژکی مرکزی در ناحیه آدورال (*Adoral*) دهانی واقع در راس سلول است که مژک ها در آن به شکل دسته های کوچک سین سیلیا (*Cyncilia*) خود نمایی

می کند. این پروتوزئرها همانند گروه های دیگر مژک داران حاوی دو هسته بزرگ و کوچک بوده و دارای یک زائده انعطاف پذیر در انتهای خود به فرم اوبوسواسپرانوم می باشند. البته تعدادی از پروتوزوئرهای این خانواده فاقد زائده انتهایی می باشد که آنها را فرم دوباردی می نامند. اندازه خانواده انتودینیدا کوچک بشمار می رود و تنها چند گونه از آنها در جنس انتودینیوم دارای اندازه بزرگ (طول ۶۰ تا ۶۱۵ میکرومتر و عرض ۳۴ تا ۷۵ میکرومتر) می باشد. محققین تا به امروز بیش از ۱۱۰ گونه در جنس انتودینیوم معرفی نموده اند که مهمترین آنها انتودینیوم کوداتوم (*E. caudatum*)، انتودینیوم بورسا (*E. bursa*)، انتودینیوم اوینیوم (*E. ovinium*)، انتودینیوم سیمپلکس (*E. simplex*)، انتودینیوم پارووم (*E. parvum*)، انتودینیوم دوباردی (*E. dubardi*)، انتودینیوم وراکس (*E. verax*)، انتودینیوم لانگینوکلاتوم (*E. longinucleatum*)، انتودینیوم بیماستوس (*E. bimastus*) و انتودینیوم الانگتوم (*E. elongatum*) می باشد.

- **سیکلوپوستیدا؛**

حضور این گروه از پروتوزوئرها در شکمبه محدود و تقریبا در راسته انتودینومورفیدا کمترین تاثیر گذاری را در تخمیر شکمبه دارند. اگر چه وجود این خانواده در نشخوارکنندگان منطقه استوایی به اثبات رسیده است، اما به دلیل تراکم اندک آنها کمتر مورد توجه کارشناسان قرار می گیرد. از بارزترین ویژگی خانواده سیکلوپوستیدا وجود یک زبان انقباضی مژک دار در دهان پروتوزوئر و اندازه های کوچک آنها می باشد. انقباض زبان کوچک که در راس سلول قرار گرفته سبب می شود زبان به داخل سلول رفته و مژک ها مخفی گردند. بعضی از کارشناسان دو جنس برای این خانواده در نظر می گیرند که جنس های پارانتودینیوم و اپی پلاسترون (*Epiplastron*) نام دارند. البته از دید بسیاری از کارشناسان این طبقه بندی مشکوک و غیر قابل پذیرش است. اما معیاری که عده ای از کارشناسان را مجاب نمود تا جنس های پارانتودینیوم و اپی پلاسترون را (بخصوص در گونه های آفریکانوم) در خانواده سیکلوپوستیدا قرار دهند، زبان انقباضی مژک دار و اندازه کوچک سلول می باشد.

- **افریواسکولسیدا؛**

این گروه از مژک داران که جایگاه آنها کاملا اثبات شده است، براساس نوع طبقه بندی می تواند به پنج و یا شش زیر خانواده تقسیم گردد. اما قریب به اتفاق، محققین آن را به پنج زیر خانواده مشخص و تایید شده دیپلودینینا (*Diplodinina*)، اپیدینینا (*Epidinina*)، اپیستوتریکینا (*Epistotricina*)، افریواسکولسینا (*Ophryoscolsina*) و کلواسکولسینا (*Coluoscolsina*) طبقه بندی نموده اند. زیر خانواده های دیپلودینینا، اپیدینینا و افریواسکولسینا به ترتیب مهمترین زیر خانواده های افریواسکولسیدا محسوب می شوند. زیر خانواده دیپلودینینا دارای دو ناحیه مژکی (یکی در نزدیکی دهان جهت فعالیت

گوارشی و دیگری دورتر از دهان و بیشتر برای حرکت سلول کاربرد دارد) در یک صفحه اسکلتی می باشد، که در راس سلول قرار می گیرد. این زیر خانواده علاوه بر دارا بودن چند واکوئل منقبض شونده و دو هسته کوچک و بزرگ مشخص، می تواند دارای یک صفحه استخوانی بیرونی و یا چند تکه باشد. شکل بدن در دیپلودینیناها پهن مشاهده می گردد. معیارهای تقسیم بندی جنس در این زیر خانواده تابع تعداد صفحات استخوانی، موقعیت صفحات و اندازه سلول است. اما معیارهای دیگری مانند موقعیت شکل هسته، تعداد و موقعیت واکوئل های ضربان دار، اندازه و شکل سلول می تواند در شناسایی گونه های این جنس بکارگرفته شوند. به دلیل ثابت نبودن زائده های سطحی بدن در جنس دیپلودینینا معیار ثابتی جهت طبقه بندی محسوب نمی شود.

تعداد جنس های شناخته شده در زیر خانواده دیپلودینینا هفت گروه می باشد که عبارتنداز (۱) دیپلودینیوم (*Diplodinium*)؛ که فاقد صفحات استخوانی با اندازه متغیر (۳۵ تا ۲۵۰ میکرومتر) می باشد و گونه های آن براساس زائده ها تقسیم شده اند، (۲) یودیپلودینیوم (*Eudiplodinium*)؛ که با صفحه اسکلتی باریک و دارای عرض کم نمایان می گردد، (۳) استراکودینیوم (*Ostracodinium*)؛ که دارای صفحه اسکلتی بزرگ است، (۴) متادینیوم (*Metadinium*)؛ با دو صفحه اسکلتی که در پایین سلول به هم جوش می خورد، (۵) انوپلوپلاسترون (*Enoploplastron*)؛ که با سه صفحه اسکلتی مجزا و یا به هم جوش خورده مشاهده می شوند، (۶) الیتروپلاسترون (*Elytroplastron*)؛ با دو صفحه اسکلتی کوچک و بزرگ مشخص می گردند، و (۷) پلی پلاسترون (*Polyplastron*)؛ که با پنج صفحه اسکلتی (صفحه آن در بالا و سه صفحه کوچکتر آن در پایین سلول) نمایان می شود. البته گروهی از کارشناسان سه جنس دیگر به این هفت جنس اضافه می نمایند که به عقیده کثیری از محققین عملی نمی باشد. این سه جنس (۱) ائودینیوم (*Eodinium*)؛ دارای کوچکترین پروتوزوئر در بین جنس های نام برده است و فاقد صفحات استخوانی می باشد، (۲) ارموپلاسترون (*Eremoplastron*)؛ این جنس حاوی یک استخوان باریک بوده که از لحاظ اسکلتی ساده ترین جنس شناخته می شود، و (۳) دیپلوپلاسترون (*Diploplastron*)؛ بسیار شبیه پلی پلاسترون بوده و فقط در اندازه و ترتیب قرارگیری صفحه اسکلتی با هم تفاوت دارند، می باشد. گونه های محدود شناسایی شده برای این سه جنس ائودینیوم لوباتوم (*E. lobatum*)، ارموپلاسترون روستراتوم (*Er. rostratum*) و دیپلوپلاسترون آفاین (*D. affine*) است. همچنین، گونه های شناسایی شده برای جنس های هفتگانه دیپلودینینا فراوان بوده (بالای ۱۴۰ گونه) و می توان مهمترین ترین آنها را دیپلودینیوم پلی گونال (*Di. polygunal*) و دنتاتوم (*Di. dentatum*)، یودیپلودینیوم ماگی (*Eu. maggii*)، استراکودینیوم گراسیل (*O. gracile*) و ماموزوم (*O. mammosum*)، متادینیوم تاریکوم (*M. taricum*) و مدیوم

(*M. medium*)، انوپلاسترون تریلوریکاتوم (*En. triloricatum*)، الیتروپلاسترون بوبالی (*El. bubali*) و پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم (*P. multivesiculatum*) نام برد.

زیر خانواده اپیدینینا دارای دو جنس شناخته شده به نام های اپیدینیوم (*Epidinium*) و اپی پلاسترون است که در مجموع دارای صفحات اسکلتی خمیده هستند. جنس اپیدینیوم دارای سه صفحه اسکلتی و ناحیه مژکی در پایین سلول بوده و شامل گونه های اپیدینیوم اکوداتوم (*E. ecaudatum*) فاقد زائده انتهایی، اپیدینیوم بیکوداتوم (*E. biecaudatum*) با دو زائده انتهایی، اپیدینیوم تریکوداتوم (*E. triecaudatum*) با سه زائده انتهایی، اپیدینیوم کوادریکوداتوم (*E. quadricaudatum*) یا چهار زائده انتهایی، اپیدینیوم پارویکوداتوم (*E. paruicaudatum*) با پنج زائده انتهایی و اپیدینیوم کاتانی (*E. catanii*) که دارای پنج زائده بزرگ یکسان هستند، می باشد. اما جنس اپی پلاسترون دارای پنج صفحه اسکلتی خمیده بوده و بسیار شبیه جنس اپیدینیوم به نظر می رسد. دو گونه معروف جنس اپی پلاسترون، اپی پلاسترون آفریکانوم (*E. africanum*) و اپی پلاسترون اسپینیسوم (*E. espinisum*) می باشد که تراکم بسیار کمی در بین دام ها دارند. اما زیر خانواده های اپیستوتریکینا، افریواسکولسینا و کلواسکولسینا هر کدام دارای یک جنس کاملا شناخته شده می باشند که براساس مطالعه ریخت شناسی جنس افریواسکولسینا پیچیده ترین آنها محسوب می گردد. جنس اپیستوتریکوم (*Epistotricum*) از زیر خانواده اپیستوتریکینا دارای یک گونه به نام اپیستریکوم جانوس (*E. janus*) می باشد که ناحیه مژکی نزدیک میانه سلول از خود نشان می دهد. و جنس افریواسکولکس (*Ophryoscolex*) از زیر خانواده افریواسکولسینا دارای ناحیه مژکی در یک سوم ناحیه پایینی سلول است که به صورت کمربندی در سه چهارم بدن ظاهر می شود. این جنس به سادگی قابل شناسایی بوده و شناسایی گونه های آن مانند افریواسکولکس کوداتوس (*O. caudatus*) و پورکنی (*O. purkynei*) بسیار مشکل می باشد. اما زیر خانواده کلواسکولسینا دارای کمربند مژکی کامل در انتهای بدن می باشد و دارای سه صفحه اسکلتی (یکی بزرگ در میانه و دو کوچک در کناره ها) همراه با زائده های بدنی (بین صفر تا پنج) قابل مشاهده است. تنها گونه معروف جنس کالواسکولکس (*Calloscolex*)، کالواسکولکس کامیلینوس (*C. camilinus*) با اشکال لیویس (بدون زائده) و کاسپیداتوس (با زائده) می باشد.

۴-۵ فعالیت های حیاتی در پروتوزوئرها

اگر چه جمعیت پروتزوئرها در شکمبه کم می باشد، اما به دلیل جثه بزرگتر از لحاظ حجمی با باکتری ها در توده زنده میکروبی شکمبه برابر خواهد بود. این توده زنده میکروبی در تخمیر شکمبه اثر بسزایی داشته و این اثر خواه مثبت و یا منفی دارای خواص منحصر بفردی می باشد. با وجود اینکه

پروتوزوئرها در مقایسه با باکتری ها تخصصی تر شده اند و دارای ساختار سلولی پیچیده تری می باشند، باز تمامی عوامل حیاتی توسط یک سلول منفرد انجام می گیرد. برای بقای گونه های پروتوزوئری لازم است تمامی شرایط چهارگانه حیات در شکمبه برقرار گردد.

۵-۴-۱ رشد

مباحث پیشین رشد (رشد بیرونی و درونی) که در بخش باکتری ها (بخش چهارم) بیان شده است، در این بخش قابل تعمیم بوده و تنها تفاوت عمده در رشد پروتوزوئرها در مقابل باکتری ها، تغییر زائده های بیرونی سلول از سلول مادری به دختری می باشد. لذا معیار شکل و اندازه بدن به تنهایی نمی تواند معیار مناسبی برای تعیین میزان رشد پروتوزوئر در نظر گرفته شود. پس برای تعیین میزان رشد درونی هر پروتوزوئر می بایست به صورت مجزا سلول را از لحظه تولد تا آخرین تغییر بدنی جهت تکثیر مجدد بررسی و مطالعه نمود. لازم به ذکر است که در هنگام تعیین رشد درونی سلول باید به تولیدمثل رویشی (جوانه زدن) دسته ای از پروتوزوئرها توجه کرد تا به عنوان رشد واقعی پروتوزوئر محاسبه نگردد. همچنین، محققین برای محاسبه نرخ رشد پروتوزوئرها در شکمبه و در حالت غیر پایدار کارشناسان معادله ۱-۵ را پیشنهاد نمودند که در آن زمان اولیه (t_1) و ثانویه (t_2)، نرخ ترقیق (D) همراه با جمعیت اولیه (x_1) و ثانویه (x_2) در نظر گرفته شده است.

معادله ۱-5:
$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1) + D$$

۵-۴-۲ تکثیر

اگر چه مطالعات کمی در زمینه تکثیر پروتوزوئرهای شکمبه صورت گرفته است، اما می توان با کمک تعیین نوع و سرعت تکثیر به صورت تخمینی میزان جمعیت آنها را در مخزن تخمیر محاسبه نمود. بدین صورت که غلظت پروتوزوئرها را در ساعات اولیه تغذیه و سپس بعد از مدتی مشخص اندازه گیری می نماییم. براساس تغییر غلظت در واحد زمانی می توان سرعت تکثیر را بدست آورد. آنگاه براساس سرعت تکثیر و حجم مخزن تخمیر، می توان به طور تخمینی غلظت پروتوزوئرها را تعیین نمود. با گذر از این موضوع می توان گفت که تکثیر در پروتوزوئرها به سه بخش عمده تولید مثل جنسی به روش الحاق محتویات سلولی و بازگشت مجدد از طریق اتصال گامت ها یا هم جوشی (*Fusion*)، تولید مثل رویشی به صورت جوانه زنی و تولید مثل غیر جنسی از طریق تقسیم سلولی به روش دوتایی طولی و یا چند تایی صورت می گیرد (شکل ۳-۵). در تقسیم دوتایی ابتدا هسته، سپس جسم پایه و به دنبال آن تقسیم طولی سیتوپلاسم صورت می گیرد. اما در تقسیم چندتایی که در دو حالت کیستی و بدون کیستی صورت می گیرد، ابتدا هسته به طور متوالی به روش میتوز تقسیم شده و به

دنبال آن با تقسیم سیتوپلاسم هر قطعه از آن یک هسته را احاطه می کند. بدین وسیله تعداد زیادی سلول دختر به وجود می آید که با از بین رفتن غشای سلولی اصلی آزاد می شوند. تقسیم سلولی و سپس الحاق مهمترین روش های تکثیر در پروتوزوئرهای شکمبه می باشد. گونه های انتودینیوم کوداتوم و افریواسکولکس پورکنی دارای تکثیر الحاقی مخصوص به خود می باشند. الحاق از طریق تقسیم میوز، میتوز، خرد شدن هسته بزرگ و جابجایی کروموزوم ها در بین دو سلول پروتوزوئری و سپس تشکیل دوباره هسته بزرگ و جدا شدن سلول ها انجام می گیرد.

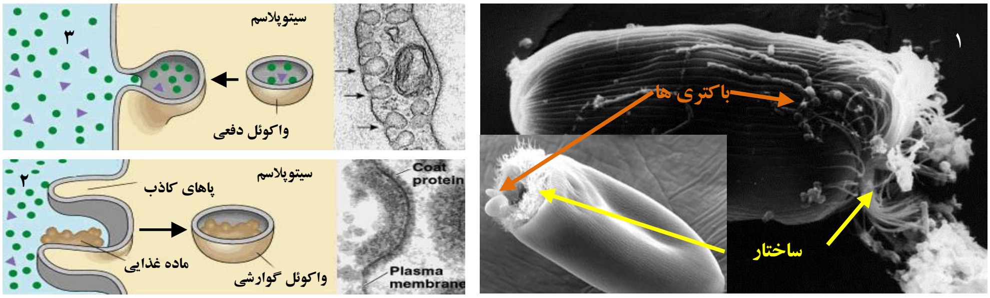
شکل ۳-۵ تکثیر جنسی و غیر جنسی پروتوزوئرها (از سمت راست شامل جوانه زنی، الحاق و تقسیم سلولی).

هر تقسیم سلولی در پروتوزوئر ها به طور تقریبی بین ۱۰ تا ۲۵ دقیقه طول می کشد. مدت زمان لازم جهت آماده سازی پروتوزوئر برای تکثیر در مخزن تخمیر طبیعی، متغیر و کمترین آن مربوط به انتودینیاها (۵/۵ ساعت) و بیشترین آن برای پلی پلاسترون ها (۱۴ ساعت) می باشد. اما در آزمایشگاه و مخازن مصنوعی زمان مورد نیاز جهت تکثیر به دلیل فقدان فاکتورهای ناشناخته تا ۳۶ ساعت به طول می انجامد. محققین اعلام نمودند که سرعت تجزیه شدن پروتوزوئرها در مخزن تخمیر معادل ۸۵ درصد سرعت تکثیر آنها می باشد. این عامل نشان می دهد پروتوزوئر می تواند مادام اعمر تا وقتی شرایط مطلوب باشد در شکمبه زندگی کند. لازم به ذکر است همه عواملی که در تکثیر باکتری ها موثر است نیز در تولیدمثل پروتوزوئرها نقش ایفا می کنند. پس در هر حالتی عوامل نامساعد یکجا و یا تک تک بروز یابد، سیستم تکثیر متوقف ودسته ای از پروتوزوئرها اقدام به تولید هاگ می نمایند. تولید هاگ بقای نسل پروتوزوئر را تضمین می کند.

۳-۴-۵ تبادل

پروتوزوئرها همانند سایر میکروارگانیسم ها نیازمند مصرف مواد مغذی (مواد معدنی، ویتامین ها، قندها، الیاف و باکتری به عنوان پروتئین) و دفع سموم (یون ها و مواد زائد حاصل از متابولیسم) خود می باشند. جهت رسیدن به این هدف پروتوزوئرها کاملا با باکتری ها متفاوت عمل می کنند. تفاوت اول؛ مربوط به دهانی است که توسط یک لوله مرئیک به واکوئل گوارشی ختم شده و پروتوزوئر ماده غذایی را بلعیده و هضم می نماید. ماده دفعی هم توسط رکتوم از پروتوزوئر دفع می گردد. این روش در هچ

یک از میکروارگانیسم های دیگر یاقت نمی شود. به همین دلیل عده ای از کارشناسان پروتوزوئر را جانوران تک سلولی مجزا از سایر تک سلولی ها در نظر می گیرند. تفاوت دوم؛ روش آندوسیتوز یا ورود مواد از محیط خارجی سلول به داخل و اگزوسیتوز یا خروج مواد از محیط داخل به خارج سلول می باشد که در بین پروتوزوئرها رایج و در باکتری ها کمتر مشاهده می گردد (شکل ۴-۵). آندوسیتوز به دو بخش پینوسیتوز (در این روش که به آشامیدن سلول نیز موسوم است؛ ابتدا مایعات و مواد محلول به واسطه های غیراختصاصی و یا اختصاصی سطح سلول متصل و سپس غشاء در آن ناحیه فرو می رود. به تدریج با افزایش عمق فرورفتگی و بهم چسبیدن لبه‌های آن قسمت فرو رفته به همدیگر ماده غذایی به صورت واکوئل در می آید. سپس واکوئل از غشای سلول جدا شده و در سیتوپلاسم رها می‌گردد. این وزیکول به لیزوزوم پیوسته و تحت تاثیر آنزیمهای آن قرار می گیرد) و فاگوسیتوز (در این روش مواد مغذی غیر محلول به شیوه تشکیل واکوئل در سطح غشاء و بدون واسطه های اختصاصی وارد سیتوپلاسم پروتوزوئر می گردد) تقسیم می شود. پروتوزوئرها برای تغذیه به هر دو روش دهانی و فاگوسیتوز نیازمند می باشند.



شکل ٤-٥ فعالیت های دهانی و ورود و خروج مواد از غشای سلول (از سمت راست شامل ۱- فعالیت دهانی، ۲- آندوسیتوز و ۳- اگزوسیتوز).

برعکس آندوسیتوز، اگزوسیتوز مواد را از محیط داخل سلول به خارج از سلول انتقال می دهد. این مواد که شامل ذرات ترشحی ساخته شده در سلول و یا مواد باقیمانده حاصل از تجزیه لیزوزوم می‌باشند، به صورت واکوئل های ترشحی یا دفعی دیده می‌شوند. پس از چسبیدن واکوئل ترشحی یا دفعی به غشای سلول، غشا در محل چسبیدگی از بین می‌رود و به این طریق محتویات واکوئل به خارج از سلول تخلیه می گردد.

۴-۴-۵ ایمنی

تغییرات نامطلوب و ناگهانی شرایط زیستی در شکمبه و سایر مخازن تخمیری سبب می شود که پروتوزوئرها همانند سایر میکروب ها قادر به فعالیت حیاتی خود نشوند. برای مبارزه با چنین شرایطی

پروتوزوئرها تنها دو راه حل اساسی را در پیش می گیرند. روش اول؛ مقاومت پروتوزوئرها در برابر شرایط نامطلوب توسط فعالیت های هاگ زایی است. این روش کارآترین روش در ایمینت پروتوزوئرها در برابر تغییرات نامطلوب مخازن تخمیری است. اما روش دوم؛ فرار از محیط نامساعد به بخش های مساعدتر مانند دیواره نگاری و هزارلا می باشد. در این روش پروتوزوئرها با کمک تاژک و مژک به بخش های مطلوب تر حرکت می کنند. البته این روش کارآیی چندان موثر نخواهد بود. در نهایت، مقاومت پروتوزوئرها در شکمبه محدودتر از باکتری ها است و با تغییرات ناگهانی از شکمبه سریعتر شسته می شوند. اما به دلیل وفور آنها در خوراک دام و انتقال سریع آن توسط دام به دام دوباره با سرعت بالایی در شکمبه منتشر می گردند. لازم به ذکر است که پروتوزوئرهای زیادی در اتصال با دیواره شکمبه دیده می شود که می تواند دوام نسل آنها را در مخزن تخمیر طبیعی مادام العمر کند.

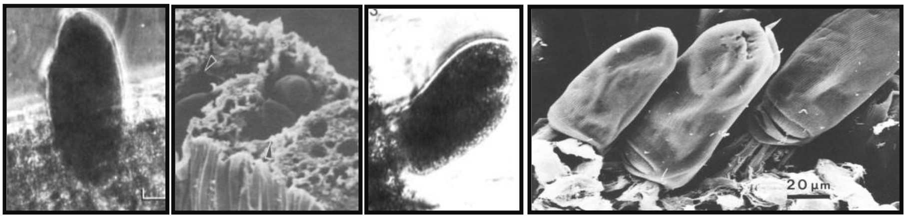
۵-۵ فعالیت تخمیری پروتوزوئرها

بررسی بر روی فعالیت های تخمیری پروتوزوئرها به دلیل کشت های محدود و تقریبا هزینه بر با مشکلات اساسی روبرو بوده است. اما به جهت نقش آفرینی پروتوزوئرها در تغذیه، تخمیر، تعادل جمعیت باکتریایی و تولیدات میزبان، شناسایی روندهای تخمیری این تک یاخته ها از اهمیت بسزایی برخوردار می باشد. بزرگترین معضل در زمینه شناسایی فرآیندهای تخمیری پروتوزوئرها، تولید محصولاتی است که با تولیدات باکتری ها همسو بوده و در صورت مجزا نمودن فعالیت های آنها از باکتری ها کاهش یا توقف رشد دسته کثیری از پروتوزوئرها رقم خواهد خورد. با این حال کارشناسان با حذف باکتری ها از طریق آنتی بیوتیک ها و یا بکارگیری سلول های شکسته شده پروتوزوئرها در کشت های انجام شده اقدام به تعیین روندهای متابولیکی پروتوزوئرها در تخمیر نموده اند.

۵-۵-۱ اتصال پروتوزوئرها به مواد مغذی

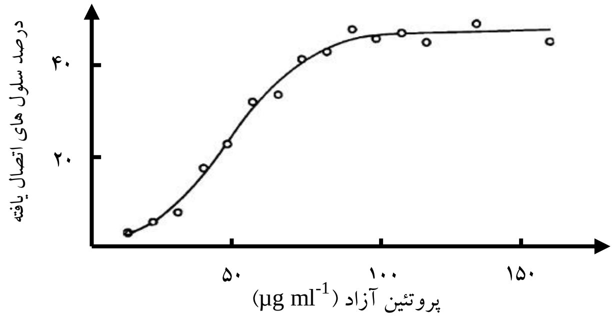
پروتوزوئرهای هاضم مواد مغذی بخصوص گروه هضم کننده بافت های گیاهی بوسیله یکسری اندامک های خاص خود که در سطوح بدنی آنها قرار دارد به ماده مغذی می چسبند (شکل ۵-۵). نمونه مشهور در این زمینه اندامک های واقع در جلوی بخش پشتی گونه های ایزوتریشیا اینتستینالیس و پروستوما می باشد. افزایش غلظت نمک در محتویات مخزت تخمیر می تواند میزان اتصال مربوطه را کاهش داده و در غیبت اسیدآمینه ال- سیستئین این اتصال متوقف می شود. این توقف به دلیل کاهش حرکت پروتوزوئر و تغییر پتانسیل ردوکس در آنها می باشد. از ناحیه اتصال جهت کسب قندهای پلی ساکاریدی پروتوزوئر وارد عمل شده و به صورت آهسته به داخل بافت گیاهی نفوذ می کند (شکل ۵-

۵). با عکس برداری های میکروسکوپی محققین براساس مکان اتصال به اندازه تقریبی طول ۴۵ میلی میکرون و عرض ۷ میلی میکرون جایگاه اتصال پی بردند.



شکل ۵-۵ اتصال پروتوزوئرهای اینتستینالیس و پروستوما را در دو تصویر سمت راست و نفوذ پروتوزوئر را در دو تصویر سمت چپ نشان می دهد.

از آنجا که پروتئین موجود در بافت های گیاهی محرک اتصال بیشتر پروتوزوئرها به بافت ها می باشد، محققین نحوه اتصال را به صورت باندهای پروتئینی می پندارند. جویدن بیشتر علوفه توسط دام می تواند صرفه نظر از کوچکتر شدن ذرات غذایی و تماس بیشتر با بافت های گیاهی، پروتئین گیاهی بیشتری را آزاد و تا ۵۰ درصد اتصال پروتوزوئری را افزایش دهد (شکل ۶-۵). بیشترین اتصال پروتوزوئر به بافت های گیاهی مربوط به برگ ها خرد شده، دنبالچه های تازه برگ ها، گل آذین و بافت های مزوفیل علوفه بوده و کمترین اتصال مربوط به ساقه و سطح برگ های گیاهانی است که پوشیده از موم، صمغ، سیلیس و غیره می باشند. البته به دلیل قرارگیری بیشترین تراکم کربوهیدرات محلول در بخش دنبالچه تازه برگ ها و گل آذین آنها اتصالات بیشتری از پروتوزوئر در آنها دیده می شود. تراکم قندهای گلوکز، فروکتوز و سوکروز در مایع شکمبه اثر بسزایی در اتصال پروتوزوئرها به بافت های گیاهی دارد.



شکل ٦-۵ اثر پروتئین آزاد بر اتصال پروتوزوئرها به بافت های گیاهی (اقتباس از اریین ۱۹۷۸).

لازم به ذکر است که اتصال پروتوزوئرها در شرایط آزمایشگاهی در مقابل محیط طبیعی به دلیل پایین تر بودن واحدهای غذایی (کاهش واحدهای غذایی پروتوزوئر را در اتصال به بافت های گیاهی و

تغذیه از آنها سوق می دهد)، حضور پروتئین آزاد بیشتر و مهاجرت کمتر پروتوزوئرها (سبب حضور بیشتر پروتوزوئر در متن تخمیر می شود) بیشتر انجام می گیرد. اطلاعات درباره نحوه اتصال پروتوزوئرها به مواد غذایی همچنان مبهم باقی مانده است. اما، محققین متوجه شده اند که پروتوزوئر به صورت متناوب و آزادانه به مواد مغذی متصل می شود. همچنین، گاهی در بعضی از پروتوزوئرها مانند انتودینومورف ها جایگاه مشخصی جهت اتصال به مواد مغذی دیده نمی شود.

۲-۵-۵ متابولیسم پروتوزوئرها

مطالعات اولیه نشان می دهد که به دلیل تراکم بالاتر مژک داران در مقایسه با تاژک داران روندهای متابولیسمی آنها از اهمیت خاصی در شکمبه برخودار است. هر کدام از پروتوزوئرهای شکمبه دارای یک جایگاه ویژه متابولیسمی هستند که در این مسیر و با وجود مواد مغذی مکفی رقابت چندانی با هم ندارند. به عنوان مثال؛ هلوتریش ها از کربوهیدارت های محلول استفاده می نمایند، در حالیکه انتودینومورف ها از کربوهیدرات های غیر محلول بهره می برند. لذا برای شناسایی دقیق تر روندهای متابولیسمی تخمیر در شکمبه پروتوزوئرها را براساس شرایط تغذیه تا حد امکان طبقه بندی نموده و بررسی می نماییم. لازم به ذکر است جهت شناسایی صحیح تر فرآیندهای متابولیسمی باید از قدرت انتخاب پروتوزوئرها بخصوص در زمینه تولیدات آنزیمی آگاهی داشت.

۱-۲-۵-۵ تخمیر کربوهیدرات ها

از آنجا که روند متابولیسمی گروه هلوتریش ها با انتودینومورف ها به دلیل اختلاف در کیفیت مواد غذایی مصرفی متفاوت است، اما حضور انتودینومورف ها در هضم مواد غذایی گیاهی موثرتر است. این تاثیر می تواند ناشی از فعالیت اختصاصی آنها در هضم سلولز و همی سلولز و ابقای بیشتر آن در شکمبه بوده باشد. با این وجود کارشناسان روند متابولیسم کربوهیدرات ها را در مژک داران را به دو بخش هلوتریش ها و انتودینومورف ها عمده تقسیم بندی می کنند.

- **تخمیر کربوهیدرات بوسیله هلوتریش ها؛**

مطالعات نشان می دهد که هلوتریش ها قادر به تخمیر ۳۰ تا ۴۰ درصدی کربوهیدارت های محلول در مقابل با باکتری ها می باشند. این گروه از پروتوزوئرها قابلیت محدودی در هضم کربوهیدرات ساختمانی خواهند داشت. اکثر قندهای ساده مونوساکاریدی (گلوکز، گالاکتوز و غیره)، الیگوساکاریدی (سلوبیوز در داسی تریشیاها) و پلی ساکاریدهای محلول (آمیلوپکتین) قابل استفاده در هلوتریش ها بوده و دامنه این تخمیر به جنس هلوتریش ها وابسته است. بطور مثال؛ گونه های ایزوتریشیا اینتستینالیس و پروستوما دانه های نشاسته را هضم نموده و هر دو گونه قدرت هضم سلوبیوز و مالتوز را

ندارند. در حالیکه گونه های داسی تریشیا فاقد قدرت هضم نشاسته می باشند. به این ترتیب، برای کنترل روندهای متابولیسمی پروتوزوئرها مسیر مشکلی وجود دارد. آزمایشات نشان می دهد که ایزوتریشیا پروستوما فروکتوز، گلوکز، سوکروز، رافینوز، پکتین را سریع تخمیر نموده و گالاکتوز و ملیبیوز را آهسته تر هضم می نماید. در تحقیقات بعدی مشخص شد که گونه پروستوما همانند داسی تریشیا رومینانتیوم قدرت هضم زایلوز، آرابینوز و لاکتوز را ندارد، در حالی که گونه های داسی تریشیا قدرت هضم اینولین را از طریق آنزیم اینورتاز به راحتی به نسل بعدی انتقال می دهند. در طی تخمیر هلوتریش ها قندهای مصرف شده را به گاز هیدروژن و دی اکسیدکربن با نسبت ۱:۱ و ۲:۱ به ترتیب، اسیدهای استیک، بوتیریک، لاکتیک با غلظت بین ۰/۰۶۲ تا ۲/۳۵ nm به ازای هر سلول هلوتریش در ساعت (تقریبا ۱۰ درصد اسیدهای چرب فرار شکمبه از پروتوزوئرها حاصل می شود) و اندوخته پلی ساکاریدی (آمیلوپکتین) که ۷۵ تا ۸۰ درصد قند مصرفی را شامل می شود، مبدل می کنند. همچنین، در فعالیت های هضمی پکتین موادی مانند اولیگو- اورونید و متانول آزاد می شود. البته در روند تولید اسیدهای تخمیری رد پای از اسید پروپیونیک هم مشاهده می گردد. میزان اسید و گاز تولید شده در تخمیر در طی فعالیت پروتوزوئرهای هلوتریش به میزان ماده غذایی در دسترس وابسته می باشد.

در آزمایشات اخیر محققین ثابت نموده اند که در نرخ بالای تخمیر، تولید اسید لاکتیک (۷۰ درصد ایزومر ال و ۳۰ درصد ایزومر دی) و در نرخ پایین تخمیر، تولید اسیدهای استیک و بوتیریک غالب می گردد. اسید استیک غالب شده یکی از سازندگان اصلی آمیلوپکتین می باشد. ذخیره سازی آمیلوپکتین در سلول های پروتوزوئری بین ۲ تا ۴ ساعت بعد از خوراک دهی به اوج خود می رسد. آمیلوپکتین انباشته شده در سیتوپلاسم سلول در زمان فقر غذایی بواسطه آنزیم آمیلاز پروتوزوئر (در اسیدیته ۴/۸ تا ۶) مورد مصرف قرار می گیرد. حضور قندهای مالتوتریوز و ایزومالتوز فعالیت آنزیم آمیلاز را با محدودیت روبرو می کند. اما، علاوه بر مواد تخمیری نام برده اگر غلظت مواد قندی در شکمبه بالا باشد، گونه های پروستوما و رومینانتیوم تولید فورمات را همانند سایر مواد تخمیری آغاز می کنند. در طی انزوا پروتوزوئر آمیلوپکتین را تخمیر نموده و ۲۴ درصد استات، ۲۳ درصد بوتیرات، ۳۴ درصد لاکتات و ۱۹ درصد دی اکسیدکربن تولید می نمایند. در بین قندهای موجود، فقط قندهای مانوز، گلوکوزآمین و گالاکتوزآمین برای هلوتریش ها مضر هستند. این دسته از قندها فرآیندهای تخمیری و تولیدات آنها را تخریب و پروتوزوئر را در کنترل ساخت آمیلوپکتین ناموفق می نماید. با این حال اثرات مضر هگزوآمین ها و مانوز در فرآیند متابولیسم کربوهیدرات ها همچنان ناشناخته باقیمانده است.

هلوتریش ها در تجزیه کربوهیدرات های ساختمانی مانند سلولز نقش کمی را ایفا می کنند. گروه کربوکسیل متیل دار شده سلولز عامل محدود کننده هضم هلوتریش محسوب می شود و تولیدات

تخمیری حاصل از فعالیت هلوتریش ها بر روی سلولز هم می تواند تا حدی به هضم سایر قندها و یا فعالیت باکتری ها وابسته بوده باشد. علاوه بر سلولز، همی سلولز هم به دلیل وجود آرابینوز و زایلان قابلیت استفاده برای هلوتریش ها ندارد. البته حضور آنزیم گلوکوزید هیدرولاز موجود در گروه هلوتریش ها می تواند مقدار کمی از همی سلولز را تجزیه نماید. در بخش کربوهیدرات ساختمانی هلوتریش ها فقط پکتین را به راحتی توسط آنزیم های استراز و پلی گالاکتوروناز خارج سلولی هضم می کنند. فعالیت گروه ایزوتریشیاها بر روی پکتین بیشتر از داسی تریشیاها می باشد.

درباره مکانیسم جذب مواد قندی می توان گفت این سیستم در هلوتریش ها همچنان مبهم است. محققین متوجه شده اند که با افزایش غلظت مواد قندی در صورت حضور باکتری ها اثری بر فعالیت جذبی پروتوزوئر نخواهد داشت. اما، یافته ها نشان می دهد که غیبت باکتری ها و افزایش غلظت قند روند جذب مواد قندی را در پروتوزوئرها متفاوت خواهد نمود. از آنجا که پروتوزوئر قدرت انتخابی یا کنترلی جذب مواد قندی را ندارد، حضور قندهای مختلف در پروتوزوئرها امری طبیعی محسوب می گردد. افزایش غلظت مواد قندی به دلیل عدم کنترل پروتوزوئر در ورود قند به داخل سلول منجر به ازدیاد قند در یاخته شده و این امر با ساخت کنترل شده آمیلوپکتین همراه خواهد بود. اما باید در نظر داشت که افزایش غلظت قند در محیط شکمبه بر روند جذب آن اثر چندانی نداشته و غلظت قند در داخل سلول پروتوزوئر هم تاثیر چندانی بر جذب قند از محیط بیرونی نخواهد داشت. لذا فقدان قدرت انتخابی قند توسط پروتوزوئر می تواند بر رقابت پذیری بهتر آنها بر جذب قند در مقابل باکتری ها موثر واقع شود. پروتوزوئر با حرکت به سمت قندهای محلول و مصرف کردن آنها از تخمیر سریع جلوگیری می نماید. لازم به تذکر است که اسیدیته شکمبه و دما همراه با سایر فاکتورهای محیطی بر جذب قند در پروتوزوئر موثر می باشند.

- **تخمیر کربوهیدرات بوسیله انتودینومورف ها (اولیگوتریش ها):**

مشاهدات میکروسکوپی و مطالعات بیوشیمیایی نشان می دهد که گروه انتودینومورف ها علاوه بر جذب و هضم اندک قندهای محلول (در غلظت کم از طریق انتقال فعال و در غلظت زیاد از طریق انتشار جذب می نمایند) مبادرت به هضم کربوهیدرات های ساختمانی مانند سلولز و همی سلولز می نمایند. البته در این زمینه انتودینیوم های کوچک تا حدی استثنا بوده و فقط دانه های کوچک نشاسته (کمتر از ۸۰۰ میکروگرم) را می بلعند. میزان بلع و هضم نشاسته توسط انتودینومورف ها به میزان ذخیره پلی ساکاریدی آنها دارد. با این وجود بیشترین فعالیت های آنزیمی آمیلاز (هاضم نشاسته) در انتودینومورف ها در گونه های ارموپلاسترون بوویس، دیپلوپلاسترون آفاین، افریواسکولکس کوداتوم، پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم و کمترین میزان آن در استراکودینیوم بیلوبوم، انتودینیوم کوداتوم و

بورسا مشاهده می شود. از آنجا که در فعالیت های تخمیری شکمبه هضم سلولز و همی سلولز اهمیت خاصی دارد، کارشناسان توانایی های هضم این دو ماده را بیشتر در گروه انتودینومورف ها پیگیری نموده اند. این گروه از پروتوزوئرها می توانند بین ۳۰ تا ۴۰ درصد از هضم کل فیبر و ۱۹ تا ۲۸ درصد از فعالیت هضم سلولزی را برعهده داشته باشند. فعالیت های همی سلولزی در هر دو جنس هلوتریش و الیگوتریش گزارش شده است. اما، فعالیت مزبور در اولیگوتریش ها ۱۰ برابر بیشتر از هلوتریش ها می باشد. کمترین فعالیت همی سلولزی از آن انتودینیوم ها و بیشترین آن مربوط به پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم است. آنزیم لازم برای شکستن همی سلولز گلیکوزیدهیدرولیاز می باشد، که در اولیگوتریش ها متداول و ضروری است. انتودینومورف ها بخش وسیعی از بافت های گیاهی مانند لایه مزوفیل، لایه پارانشیمی، پوشش های سطحی و لایه اپیدرم را هضم می کنند. با غیبت گروه انتودینومورف ها مقداری از فعالیت های گروه هلوتریش ها به دلیل فقدان قندهای آزاد شده از بافت های گیاهی کاهش می یابد. انتودینومورف ها برای تخمیر کربوهیدرات های ساختمانی نیاز به دمای مطلوب ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی گراد و اسیدیته ۵/۵ تا ۶/۱ را دارند. اما مانعی در تفسیر بیوشیمیایی هضم سلولازی پروتوزوئرها دیده می شود. از آنجا که باکتری ها همواره به سطح پروتوزوئر چسبیده اند و حتی در سیتوپلاسم آنها نیز به صورت آزادانه مشاهده می شوند، روندهای متابولیسمی کربوهیدرات های مصرفی را از جانب پروتوزوئر با شک و تردید همراه نموده است. به همین دلیل کارشناسان از طریق روش های سیتوشیمیایی اقدام به تعیین جایگاه ساخت آنزیم های هضم مواد کربوهیدراتی پرداخته و محل ترشح آنها را مشخص نموده اند.

تخمیر قندهای ساختمانی توسط اولیگوتریش ها منجر به تولید اسیدهای استیک، بوتیریک، مقدار ناچیز لاکتیک، مقداری اسید پروپیونیک، فرمیک، دی اکسیدکربن، گلیسرول و هیدروژن می شود. افزایش غلظت اکسیژن بیش از ۳ میکرومول تولید اسید استیک، هیدروژن و دی اکسیدکربن پروتوزوئرها را کاهش می دهد. البته دیده شده است که بعضی از پروتوزوئرها در روند انتقال الکترون و فسفریلاسیون از اکسیژن استفاده می نمایند.

آزمایشات هضمی کربوهیدرات در گروه انتودینیوم ها مانند انتودینیوم کوداتوم و سیمپلکس مشخص نمود که آنها قادر به هضم سلوبیوز، گلوکز، سوکروز، مالتوز و نشاسته محلول می باشند. همچنین، ثابت گردید که برداشت قند در جنس انتودینیوم بصورت فعال و غیر فعال صورت می گیرد. اما در همین آزمایشات مشخص شد که اپیدینیوم ها در حضور باکتری ها قدرت هضم همی سلولز، زایلوبیوز، سلوبیوز، سوکروز، ایزومالتوز و ملیبیوز را دارند. در حالی که در زمان فقدان باکتری قادر به هضم سلوبیوز، گهگاهی مالتوز و سوکروز نمی باشند و نیاز قندی خود را از بلعیدن نشاسته تامین می

کنند. لازم به ذکر است تجزیه سلولز در اپیدینیوم ها دیده نشده است. البته آنزیم های زایلوزیداز، سلوبیوزیداز، زایلاناز، کربوکسی متیل سلولاز، آرابینوزیداز و هگزوزیدازها در آنها مشاهده می شود. گونه های یودیپلودینیومی هم می توانند زایلودکسترین، سلودکسترین، مالتوز، سلوبیوز، سوکروز و تا حدی همی سلولز را هضم نمایند اما فاقد قدرت هضم واقعی پکتین و سلولز می باشند. گونه های پلی پلاسترون هم قدرت هضم مناسب سلولز، سلوبیوز، پکتین و اینولین را دارا می باشند. توان فعالیت های هضم سلولزی انتودینومورف ها همچنان در حال بررسی می باشد (جدول ۱-۵). مقدار فعالیت هضم سلولزی به شرایط رشد، منبع غذا و نوع گونه ها در کنار باکتری بودن و یا نبودن وابسته است. بهترین اسیدیته برای فعالیت های هضم سلولزی بین ۵ در سلولز میکروکریستالی تا ۶/۵ برای آزور سلولز متفاوت است.

جدول ۱-۵ فعالیت هضمی سلولز توسط دسته ای از انتودینومورف ها.

گونه پروتوزوئری	درجه فعالیت	گونه پروتوزوئری	درجه فعالیت
اپیدینیوم کوداتوم	قوی	یودیپلودینیوم بوویس	متوسط
استراکودینیوم دلوبوم	قوی	متادینیوم افینی	متوسط
یودیپلودینیوم مگی	قوی	دیپلودینیوم پنتاکانتوم	ضعیف
افریواسکولکس کوداتوس	متوسط	انتودینیوم کوداتوم	جزئی
پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم	متوسط		

۲-۲-۵-۵ تخمیر پروتئین ها

از آنجا که قابلیت هضم پروتئین میکروبی و غذایی در پروتوزوئرها به وفور مشاهده می شود، کارشناسان به تجزیه و تبدیل پروتئین توسط پروتوزوئرها اهمیت های ویژه ای نشان دادند. فعالیت های هضمی پروتئین توسط جمعیت باکتریایی شکمبه با حضور پروتوزوئرها پر رنگ تر می شود. اگر چه این تک سلولی ها در عبور پروتئین های میکروبی و غیر محلول نقش اساسی بازی می کنند، اما خود دارای فعالیت های هضم پروتئین و ساخت اسیدهای آمینه مانند لیزین، تریپتوفان، آرژنین، پرولین، اورنیتین، سیترولین، ترئونین و متیونین می باشند. پروتئاز مژک داران در محدوده وسیعی از اسیدیته شکمبه فعالیت می نماید و می تواند اسیدهای آمینه آزاد تولید نماید. پروتئولیز توسط پروتوزوئرها، اسیدهای آمینه کافی برای تکثیر سلولی را فراهم می کند که تنها هر ۲۴ ساعت یک بار در سلول اتفاق می افتد. البته پروتئین های مصرفی بویژه اسیدهای آمینه می تواند از راه بلع دهانی و همچنین از طریق انتقال فعال و انتشار پوستی جذب سلول شده و نیاز به ساخت آن نباشد. در نهایت محققین متوجه شده اند که فعالیت های آمین زدایی و ترانس آمیناسیون پروتوزوئرها در متابولیسم پروتئین ۳ برابر باکتری ها بوده و جذب

آمونیاک در پروتوزوئرها نیز مشاهده می شود. اما فعالیت هضم اوره ای توسط مژک داران همچنان در پرده ابهام قرار دارد. با این حال تولیدات عمده پروتوزوئرها در تجزیه و ساخت مواد پروتئینی اسیدهای آمینه (بطور مثال؛ والین، آلانین، پرولین، گلوتامات، لیزین و غیره)، مقدار کمی پپتید، تولیدات ناشی از شکستن باندهای پروتئینی (مانند ال- پایکولیک اسید تولید شده از لیزین، گاما آمینووالریک اسید تولید شده از آرژنین، متیونین سولفوکساید تولید شده از متیونین و ۲-آمینوبوتانیک اسید تولید شده از ترئونین) و بعضی از ترکیبات نیتروژنی می باشد.

در طی آزمایشات انجام شده محققین بر این باور رسیده اند که ترکیبات نیتروژن خروجی از پروتوزوئرها در متابولیسم پروتئین به اسیدهای آمینه خارج سلولی وابسته نبوده و بالعکس به طول مدت زمان حضور پروتئین در محیط و قابلیت هضم پروتئین مصرفی ارتباط دارد. سطوح بالای اسیدهای آمینه ظاهرا اثر عکس و سمی بر جمعیت دسته ای از پروتوزوئرها مانند ایزوتریشیاها می گذارد. متابولیسم پروتئین در داخل سلول پروتوزوئر مانند داسی تریشیاها یا ایزوتریشیاها به کربوهیدرات جذب شده (گلوکز، گالاکتوز و غیره)، سدیم بی کربنات، کاتیون های منیزیوم، پتاسیم و منگنز و بعضی از اسیدهای چرب مانند استات وابسته است.

منابع عمده کسب پروتئین توسط پروتوزوئرها ترکیبات پروتئین گیاهی یا جانوری و پروتئین حاصل از بلع باکتری ها می باشد. کسب اسیدهای آمینه از طریق بلع باکتری از مهمترین منابع کسب پروتئین در پروتوزوئرها بوده و جایگزین مناسبی برای آن وجود ندارد. در هلوتریش ها بلع باکتری تقریبا به صورت انتخابی انجام می گیرد و مژک دار می تواند از باکتری های چسبیده در سطح بدن (۲۰-۱۰ باکتری در هر ۲۰۰ میکرومترمربع از سطح بدن) و یا معلق در مایع مخزن تخمیر استفاده نماید. علت فرضیه انتخابی بودن مصرف باکتریایی وجود دسته های خاص باکتری در واکوئل های گوارشی پروتوزوئرها می باشد. بدین صورت که آلگ های آبی که دسته ای از باکتری ها هستند (مانند متانوژن ها)، در واکوئل باکتری داسی تریشیا رومینانتیوم دیده نمی شوند. و یا در واکوئل های گوارشی ایزوتریشیا پروستوما بیشتر باکتری های میله ای مانند اشریشیاکلی مشاهده می شود. اسیدهای آمینه حاصل از هضم باکتری ها بدن تغییر و بطور مستقیم بر ساخت پروتئین در پروتوزوئر وارد می گردند. در طی هضم پوشش پپتیدوگلایکان باکتری ها کاملا تجزیه و به لیزین، پایکولیک اسید و دی آمینوپیملیک اسید تبدیل می شود. اما مدارکی وجود ندارد که اثبات کند نیتروژن اسیدهای نوکلوئیک حاصل از باکتری ها مانند پورین ها و پیریمیدین ها مورد استفاده قرار می گیرد.

دست آخر قابلیت هضم و ساخت پروتئین در گروه انتودینومورف ها بسیار محدودتر از گروه هلوتریش ها بیان می شود. اما بیشترین فعالیت های هضم و ساخت پروتئین در گروه انتودینومورف ها

مربوط به گونه های یودیپلودینیوم مگی و پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم خواهد بود. در عین حال کمترین فعالیت هم در گونه های انتودینیوم و اپی دینیوم دیده می شود. فعالیت گونه های ایزوتریشیا و داسی تریشیا بسیار بالاتر از گونه های نام برده در اولیگوتریش ها می باشد.

۳-۲-۵-۵ تخمیر چربی ها

چربی های موجود در پروتوزوئرها را می توان به دو بخش عمده ۷۰ درصد فسفولیپید (۱۹/۶ درصد فسفاتیدیل کولین، ۱۴/۷ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین، ۱۵/۴ درصد فسفاتیدیل اتانول آمین پلاسمالوژن و ۲۰/۳ فسفولیپیدهای ناشناخته) و ۳۰ درصد غیرفسفولیپید (۱/۱۴ درصد واکس ها و هیدروکربن ها، ۲/۰۴ درصد الکل، ۱/۴۴ درصد مونوگلیسرید، ۳/۰۳ درصد دی گلیسرید، ۱/۱۴ درصد گلیسریدهای ناشناخته، ۲/۰۴ درصد هیدروکسی اسید، ۹/۶ درصد اسیدهای چرب آزاد، ۵/۵۵ درصد استرول و ۴/۰۲ درصد غیرفسفولیپیدهای ناشناخته) طبقه بندی نمود. بیشترین اسید چرب موجود پالمیتیک و کمترین مربوط به اسیدهای چرب ۱۸ کربنه می باشد. البته اسیدهای چرب شاخه دار به میزان کمی نیز مشاهده می شود. فسفولیپیدهای پروتوزوئری مشابه با باکتری ها بوده و اسیدهای چرب آنها بیشتر از نوع آلفا است. بعضی از فسفولیپیدها مانند فسفاتیدیل-ان-(۲-هیدروکسی اتیل) آلانین مختص پروتوزوئرها بخصوص مژک داران بوده و در باکتری ها مشاهده نمی شود.

پروتوزوئرها می توانند چربی های حیاتی خود را در هنگام فقر چربی در غذا تولید نمایند. نمونه آن در داسی تریشیا رومینانتیوم مشاهده می گردد که با تغییر اسید استیک به اسید چرب ساخت چربی آغاز می شود. بطور تقریبی ۲۰ تا ۳۰ درصد چربی های موجود در سلول پروتوزوئر از اسید استیک و ۱ تا ۵ درصد چربی ها از قندهای گلوکز و گالاکتوز تهیه می گردد. در این بین ساخت اسیدهای چرب بلند زنجیر از اسیدهای چرب کوچکتر که خود از اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک و ایزولوسین تهیه می شوند، انجام می گیرد. در طی ساخت اسیدهای چرب، اسید استیک و بوتیریک به دلیل داشتن کربن های زوج سازنده اسید چرب پالیمیتیک و اسید پروپیونیک به دلیل داشتن کربن فرد سازنده اسید چرب پنتا و هپتا دکانوئیک اسید (C15 و C17) می باشند. پروتوزوئرها می توانند اسیدهای چرب غیراشباع (دارای یک باند دوگانه) مورد نیاز خود را از مسیر ساخت اسید چرب تهیه نمایند. اما نوع غیراشباع با باندهای چندگانه را از خوراک مصرفی تهیه می کنند. برای رشد میکروارگانیسم ها علاوه بر اسیدهای چرب گروه استرول هم نیاز دارند که به دلیل ساخت کم آن در پروتوزوئرها نیاز به استرول خارجی (موجود در مواد غذایی مصرفی) قطعی می باشد. برای ساخت استرول در هنگام فقر غذایی شدید پروتوزوئر از دو ماده اصلی استات و موالونات استفاده می نماید. در نهایت پروتوزوئرها چربی مورد نیاز خود را بیشتر از هضم باکتری ها و چربی غذایی تهیه می نمایند.

سهم پروتوزوئر در تجزیه چربی شکمبه تقریبا ۲۰ تا ۷۵ درصد از کل فعالیت تجزیه چربی توسط میکروب های شکمبه است. البته پروتوزوئرها در مسیر اشباع سازی چربی یا دخالتی ندارند و یا در صورت ایفای نقش میزان آن بشدت محدود است. تنها مثال مشاهده شده در این زمینه اشباع سازی اسید چرب اولئیک به استئاریک می باشد که توسط گونه های ایزوتریشیا اینتستینالیس و پروستوما انجام گرفته است. همچنین پروتوزوئرها اسیدهای چرب بلند زنجیره خود را که در استر فسفولیپیدها و استرول بکار می برند، بیشتر از خارج سلول تهیه می نمایند.

آزمایشات نشان می دهد که افزایش ۱۰ تا ۱۵ درصدی چربی به جیره نشخوارکنندگان سبب کاهش تعداد پروتوزوئرهای شکمبه خواهد شد. این کاهش ناشی از اثر سمی اسیدهای چرب آزاد و نرخ پایین جذب پروتوزوئر به مواد جامد قابل تجزیه می باشد. استفاده از اسیدهای چرب غیر اشباع اگر چه سمیت کمتری مشاهده می شود، اما میزان کاهش پروتوزوئرها نیز همانند اثر اسیدهای چرب اشباع معنی دار می باشد.

۳-۵-۵ متابولیسم میانی در پروتوزوئرها

شناسایی متابولیسم میانی پروتوزوئرها به دلیل تنوعات گونه ای در متابولیسم با مشکلات زیادی همراه است. با این حال شناسایی روندهای میانی متابولیسم می تواند ما را در زمینه کنترل تغذیه و تغییر جمعیت های آنها یاری دهد. مسیرهای میانی درباره ساخت اسیدهای چرب فرار تقریبا از طریق برچسب گذاری های رادیواکتیو تعیین شده و متابولیسم قندها بواسطه تبدیل گلوکز به پیروات و مسیر امبدن-میرهوف انجام می گیرد. مسیرهای گلایکولیز، تری کربوکسیلیک اسید و چرخه گلی اگزالات کاملا در انتودینیوم کوداتوم قابل رویت می باشد. اما مسیر کربوکسیلیک و گلی اگزالات در داسی تریشیا رومینانتیوم وجود ندارد. این نشان می دهد که مسیرهای میانی پروتوزوئرها از گونه به گونه متفاوت خواهد شد. این مسیرهای تخمیری در اندامک های ریز سیتوپلاسمی و ارگانل های زیر سلولی که مشابه با هیدروژنوزومال تاژک داران می باشد، انجام می گیرد. اما آنزیم های وابسته به این اندامک ها و نوع احیای کوآنزیم آ در مژک داران کاملا با تاژک داران متفاوت می باشد. نهایتا این اندامک ها از آنزیم های حساس مانند دهیدروژنازها که به اکسیژن حساس هستند، حمایت می کند. بیشترین مسیری که ATP برای گونه های هلوتریش تولید می نماید (۴ تا ATP از گلوکز)، مسیر گلایکولیز است که از مسیر گلوکز به پیروات و نهایتا استات ختم می گردد. مهمترین آنزیم های شناخته شده در مژک داران استیل کوآنزیم آ : استیل کوآنزیم آ سی ترانسفراز، ۳-هیدروکسی بوتیریل کوآنزیم آ دهیدروژناز، ۳-هیدروکسی آسیل کوآنزیم آ هیدرولازها و ۳-هیدروکسی آسیل کوآنزیم آ ردوکتازها می باشد. آنزیم

فسفات بوتیریل ترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز و بوتیرات کینازها هم در اکثر مژک داران یافت می شود. انتقال الکترون در استیل کوآنزیم آ به اکسید- ردوکتاز نیکوتین آمید آدنین دی نوکلوتید (NADH) وابسته می باشد.

۵-۵-۳-۱ فعالیت های تنفسی در پروتوزوئرها

عده ای از محققین مدعی شدند که حضور اکسیژن در بخش مایع و گاز محتویات شکمبه سبب حرکت پروتوزوئرها و دوام بیشتر آنها به دلیل مصرف اکسیژن می شود. اما این فرضیه به دلیل بی هوازی بودن پروتوزوئرها در شکمبه همچنان با شک و تردیدهایی مواجه است. البته لازم به ذکر است که دسته ای از پروتوزوئرها دارای قدرت مقاومت در برابر حضور اکسیژن را داشته و با مصرف همزمان آن در فسفریلاسیون انرژی تولید می کنند. در پروتوزوئرهای هوازی اکسیژن در میتوکندری در زنجیره تنفسی مورد استفاده قرار می گیرد. اما پروتوزوئرهای بی هوازی شکمبه فاقد میتوکندری بوده و اندامک های موجود در سیتوپلاسم سبب استفاده از اکسیژن با غلظت کم در آن می شود. ازدیاد اکسیژن در ایزوتریشیاها سبب افزایش تولید استات شده و با ازدیاد دی اکسیدکربن تولید بوتیرات افزایش می یابد. به دلیل فقدان سیتوکروم ها در پروتوزوئرهای بی هوازی فعالیت های نهایی اکسیژن مبهم باقی مانده است. با این وجود مصرف اکسیژن در دسته ای از پروتوزوئرها قطعی بوده و ارزیابی ها نشان می دهد که گونه های ایزوتریشیا pmol ۳ اکسیژن به ازای هر سلول در دقیقه مصرف می نمایند. در نهایت ۷ تا ۱۵ درصد اکسیژن موجود در محتویات شکمبه (به صورت فاز مایع و گاز) توسط پروتوزوئرها مصرف می شود.

۵-۶ جمعیت پروتوزوئرها

اهمیت جمعیت پروتوزوئر در مخزن تخمیر به میزان نقشی که آنها در فرآیندهای تخمیری و تولیداتش بازی می کنند، دارد. برای تعیین نقش تخمیر کارشناسان ساده ترین راه حل یعنی حذف کامل پروتوزوئر از شکمبه را توصیه می نمایند. در این حالت می توان مخزن تخمیر فاقد پروتوزوئر را با حاوی آنها مقایسه نمود. برای حذف کامل پروتوزئر می توان از تزریق اسیدکلریدریک، گرسنگی طولانی مدت (تا هفت روز) و استفاده از سولفات مس (۲ درصد) یا دودسیل سدیم سولفوکسینات همراه با گرسنگی در شکمبه و شستشوی هزارلا جهت عدم تلقیح پروتوزوئر توسط آن بهره برد. با این آزمایش محققین پی بردند که عدم حضور پروتوزوئرها در شکمبه برای رشد میزبان بی تاثیر و یا کم تاثیر است. امروزه تحقیقات نشان داده است که حذف پروتوزوئرها سبب ازدیاد باکتری ها، اندکی کاهش هضم ماده آلی، نشاسته، سلولز و ADF در شکمبه و بالطبع کاهش جزئی رشد شکمبه (البته

هضم در کل دستگاه گوارش کاهش نمی یابد که علت آن مربوط به ازدیاد هضم در بخش های پایین تر دستگاه گوارشی است)، کاهش غلظت آمونیاک و اسیدهای چرب فرار (به دلیل عدم هضم باکتری توسط پروتوزوئر و آزاد نشدن آمونیاک و اسیدچرب فرار از باکتری)، افزایش اسیدیته، کاهش متان تولیدی، کاهش خاصیت هضم پروتئین و افزایش بازده ساخت پروتئین میکروبی می شود. حضور پروتوزئر می تواند سبب کاهش تعداد باکتری های شکمبه شده و تعادل را به آن ارائه دهد. پروتوزوئر با داشتن قابلیت هضم پروتئینی بالاتر از باکتری (دارای ارزش بیولوژیکی ۸۲ درصد و قابلیت هضم ۸۰ درصد) می تواند پروتئین از دست رفته را به واسطه بلع باکتری توسط پروتوزوئر، جبران نماید. همچنین پروتئین پروتوزوئر از پروتئین گیاهی متعادل تر و از لحاظ لیزین غنی تر می باشد. البته حضور پروتوزوئر در هنگام فقر پروتئینی جیره و به دلیل خاصیت عبوری کم (۶۵ درصد پروتوزوئرها در شکمبه هضم می شوند) از شکمبه مضر خواهد بود. لذا به شرط احتیاط می توان گفت پروتوزوئرها نه نفعی دارند و نه ضرری، بلکه به شکل مسالمت آمیز در مخزن تخمیر زندگی می کنند. البته حضور پروتوزوئر در شکمبه می تواند سبب آهسته تر شدن روند تخمیر و ثابت ماندن شرایط محیطی شکمبه شود.

لازم به ذکر است پس از حذف کامل پروتوزوئر از شکمبه و عدم نگهداری دام در شرایط ایزوله، تک یاخته ها می توانند دوباره پس از ۳-۱ هفته در شرایط عادی و تا چند هفته در شرایط نامناسب تر در شکمبه ظاهر و به حداکثر حضور گونه ای دست یابند.

۱-۶-۵ اثر خوراک بر جمعیت پروتوزوئرها

یکی از عواملی که می تواند به صورت گسترده بر جمعیت و توزیع گونه های پروتوزوئری همانند باکتری ها موثر واقع شود، خواص فیزیکی و شیمیایی خوراک مصرفی می باشد. این خاصیت را می توان در سه بخش دفعات و سطح خوراک دهی و ترکیب جیره مورد بررسی قرار داد. از آنجا که پروتوزوئرها همانند باکتری ها در مقابل گرسنگی به دلیل تغییر اسیدیته، اکسیداسیون- احیاء و تغییر فشار اسمزی مایع شکمبه حساس هستند، با افزایش تعداد دفعات خوراک دهی می توان این تغییرات را به حداقل رساند و حضور آنها را در محیط شکمبه افزایش داد. بطور مثال؛ خوراک دهی دام در دو وعده در مقایسه با یک وعده جمعیت پروتوزوئرها را تقریبا تا دو برابر افزایش می دهد. اما افزایش غلظت پروتوزوئرها براساس وعده خوراک دهی همواره به صورت تصاعدی صورت نمی گیرد، بلکه محیط را برای تکثیر بیشتر پروتوزوئرها در مخزن تخمیر مساعد می نماید. بدین ترتیب که جمعیت پروتوزوئرها در یک بار تغذیه $۱/۱۵ \times ۱۰^۶$ می باشد، حال اگر تا چهار بار در روز دفعات خوراک دهی

افزایش یابد جمعیت پروتوزوئرها به ۱۰۶× ۳/۱۴ افزایش می یابد. ولی اگر دفعات تغذیه به دوازده بار در روز افزایش یابد، جمعیت از ۱۰۶× ۳/۵ فراتر نخواهد رفت.

تغییرات روزانه جمعیت پروتوزوئرها براساس مصرف خوراک و دفعات آن نشان داده است که قبل از مصرف غذا غلظت پروتوزوئرها همواره بالا بوده و در طول ۰ تا ۲ ساعت بعد از خوراک دهی این میزان بالاتر می رود. اما جمعیت پروتوزوئرها با گذشت زمان (بعد از ۲ ساعت خوراک دهی) افت فاحشی نموده و در طی ۶ ساعت بعد از مصرف غذا به کمترین میزان خود می رسد. این کاهش می تواند ناشی از افزایش اسیدیته، مهاجرت یا انزوای پروتوزوئرها به بخش های دیگر مانند نگاری و یا شسته شدن پروتوزوئر ناشی از عبور مواد غذایی از شکمبه باشد. البته تغییر جمعیت پروتوزوئرها در دفعات بالای خوراک دهی به دلیل ثبات بیشتر محیط شکمبه و در شرایط آزمایشگاهی به دلیل ترقیق و انزوای ناچیز آن با نوسان کمتری روبرو خواهد بود. کارشناسان درباره عامل مهاجرت یا انزوای پروتوزوئرها در تغییرات روزانه پروتوزوئرها اتفاق نظر ندارند. مناسب ترین فرضیه ارائه شده در این زمینه مربوط به ذخیره غذایی پروتوزوئرها است. با ورود پلی ساکارید و سایر مواد مغذی به شکمبه (براساس خاصیت شیموتاکسی) پروتوزوئرها به آنها حمله و ذخیره مورد نظر را تا ۲ ساعت اول کسب می نمایند. سپس به بخش های دیگر مانند نگاری رفته و مخفی می شوند. در طی انزوا از پلی ساکاریدهای ذخیره ای استفاده می کنند. ظاهرا عامل کنترل کننده انزوا یا مهاجرت پروتوزوئرها ذخیره پلی ساکاریدی سلول می باشد. بنابراین نمونه گیری در زمان انزوا و یا حمله پروتوزوئرها به خوراک، سبب خطای غیر عمد در تعیین غلظت پروتوزوئرها می شود. لذا برای تعیین اثر ماده خوراکی، دفعات خوراک دهی، خواص جیره مصرفی، خصوصیات محیط شکمبه، میزبان و سایر معیارها بر جمعیت پروتوزئر لازم است مبانی رفتار آنها مدنظر قرار گیرد.

سطح خوراک دهی از فاکتورهای مهم دیگری در تعیین غلظت پروتوزوئرها می باشد. آزمایشات نشان داده است که شکل جیره و اثر آن بر سطح مصرف می تواند تاثیر سریعی بر غلظت پروتوزوئرها داشته باشد. بطور مثال؛ جیره های آسیاب شده، پلت و آردی سبب ازدیاد مصرف ماده غذایی و بالبطع باعث حذف گونه های پروتوزوئری می شود. این کاهش شدید و یا حذف کامل می تواند ناشی از دو عامل کلیدی نرخ عبور و اسیدیته شکمبه صورت گیرد. با افزایش مصرف خوراک نرخ عبور سریعتر می شود و احتمال عبوری شدن پروتوزوئرها و کمبود زمان تکثیر جهت بقا قوت خواهد گرفت. همچنین، افزایش اسیدیته شکمبه هم سبب برهم خوردن تعادل در پروتوزوئرها شده و به صورت تدریجی در pH زیر ۵/۵ حذف خواهند شد. البته مسیر دوم با ایراداتی همراه است و روش اول مورد اتفاق محققین قرار دارد.

کارشناسان درباره تغییرات غلظت ترکیب جیره همچنان اتفاق نظر دقیقی ارائه نمی دهند. علت این مسئله را می توان به تغییرات گسترده جیره به خاطر متغیر بودن خاستگاه تامین جیره، مراحل رشدی متفاوت در گیاهان مصرف شده و تنوع گونه های گیاهی حتی موجود در یک خانواده مربوط دانست. با وجود این محققین بر این باور هستند که تغییر جیره از حالت علوفه کامل به جیره حاوی علوفه – مواد متراکم و مواد متراکم به صورت ۱۰۰٪ در جیره می تواند غلظت پروتوزوئرها را دگرگون نموده و غلظت پروتوزوئر را به احتمال ۹۰ درصد افزایش دهد (بعضی از گونه ها مانند جنس داسی تریشیا با کاهش روبرو بوده است). بطور مثال؛ در یکی از آزمایش های انجام شده تعداد پروتوزوئرها در جیره علوفه کامل ۱۰۵× ۱±۵ در هر میلی لیتر مایع شکمبه بوده است که با تغییر جیره به علوفه (۴۰ درصد) و مواد متراکم (۶۰ درصد) و طی مرحله عادت پذیری تعداد پروتوزوئرها به ۱۰۶× ۰/۴±۱/۴ در هر میلی لیتر مایع شکمبه رسید. افزایش انرژی جیره می تواند یکی از عوامل ازدیاد غلظت پروتوزوئرها به دلیل ازدیاد باکتری ها در شکمبه باشد. افزایش سطوح انرژی با کاهش پروتئین می تواند اثری مشابه آزمایش فوق در پی داشته باشد، اما این افزایش به شکل کمتری رخ خواهد داد. تغییرات ترکیبات جیره به هر صورتی می تواند بر غلظت پروتوزوئرها به شدت موثر باشند. مثلا تغییر پروتئین گیاهی به اوره با ثابت ماندن سطح انرژی، سبب ازدیاد پروتوزوئرها می شود و یا تغییر علوفه از لگوم به گرامینه می تواند غلظت پروتوزوئرها را افزایش دهد. همچنین افزایش اسیدهای چرب ۱۸ کربنه، فقر کولین و سایر مواد مغذی می توان سبب کاهش غلظت پروتوزوئرها به دلیل مرگ آنها گردد.

۲-۶-۵ اثر خصوصیات مخزن تخمیر بر جمعیت پروتوزوئرها

خصوصیات مخزن تخمیر از عوامل بسیار مهم در تغییر غلظت پروتوزوئرها محسوب می شود. کوچکترین تغییر در هر یک از خصوصیات اصلی مخزن تخمیر مانند اسیدیته، اکسیداسیون- احیاء، تغییر اسمولاریته، تجدید محتویات شکمبه، سرعت و توزیع تخمیر می تواند سبب حذف یا گسترش یک یا چند گونه پروتوزوئری گردد. افزایش اسیدیته شکمبه سبب کاهش ناگهانی و در طولانی مدت باعث حذف کامل پروتوزوئرها از شکمبه می شود. اما با به تعادل رسیدن اسیدیته شکمبه بعد از مصرف خوراک حضور پروتوزوئرها از ۶ تا ۸ ساعت بعد از شوک اسیدی (به دلیل تراکم بالای مصرف مواد قندی محلول) آغاز و به حداکثر می رسد. آزمایشات روزانه نشان می دهد بین اسیدیته و جمعیت پروتوزوئری شکمبه یک رابط معنی دار و معکوسی وجود دارد. با افزایش اسیدیته شکمبه می توان ظرف ۳ تا ۶ هفته جمعیت هلوتریش ها را به صفر رساند. افت pH به زیر ۵/۵ و ثابت ماندن آن در طول زمان می تواند تکثیر و رشد پروتوزوئرها را متوقف و عبور آنها از شکمبه را تشدید نماید. اما دسته ای از

آزمایشات نشان داده است که گروه الیگوتریش ها در مقابل تغییرات اسیدیته مقاومتر و در محدوده ۵/۲ = pH تکثیر خود را انجام می دهند. در هنگام بازگشت پروتوزوئرها به شکمبه بعد از یک شوک اسیدی و حذف کامل آنها، جنس های انتودینیوم اولین پروتوزوئرهای وارد شده محسوب می شوند. و تا زمانی که اسیدیته مخزن تخمیر به ۶/۵-۶ نرسد الیگوتریش ها و دسته ای از هلوتریش ها باز نخواهند گشت. با وجود مسلم شدن تاثیرات اسیدیته در کاهش غلظت پروتوزوئرها کارشناسان تضادهایی را در آزمایشات اخیر خود (جیره های حاوی ۱۰۰ درصد علوفه، نصف ماده متراکم و ۷۵ درصد ماده متراکم به ترتیب دارای ۱۰۵× ۳/۶، ۱۰۵× ۴/۶ و ۱۰۵× ۸/۰ عدد پروتوزوئر در هر میلی لیتر مایع شکمبه می باشد) مشاهده نموده اند که می تواند بیانگر تاثیر همزمانی یک معیار دیگر مانند نرخ ترقیق، فعالیت های نشخوار، اکسیداسیون- احیاء، مهاجرت و انزوا، عوامل شناخته شده و ناشناخته با اسیدیته در شکمبه باشد. این تغییر در روند جمعیتی آزمایش فوق می تواند ناشی از تجمع یون هیدروژن در باکتری ها بواسط استفاده از ترکیبات بافری موجود در علوفه و عدم نوسان اسیدیته صورت گرفته باشد. لذا برای تعیین اثر اسیدیته لازم است نوع و کیفیت ماده خوراکی مانند نوع علوفه و نشاسته مصرفی مدنظر قرار گیرد.

تغییرات اکسیداسیون- احیاء محیط شکمبه هم بر اثر تجمع یون هیدروژن از مواردی است که می تواند با اسیدیته ارتباط مستقیم داشته و بر کاهش پروتوزوئرها از طریق توقف تبادلات پروتوزوئری موثر واقع شود. همواره تجمع یون هیدروژن بعد از مصرف خوراک به مدت ۲ تا ۵ ساعت دیده شده است که سبب کاهش غلظت پروتوزوئرها در شکمبه می گردد. اما با کاهش تجمع یون هیدروژن و جذب اسیدهای چرب فرار از محتویات شکمبه (که بر اسیدیته موثر هستند) میزان تجمع پروتوزوئرها افزایش یافته و به حالت طبیعی باز می گردند. لذا تغییرات اکسیداسیون- احیاء و اسیدیته می تواند در یک راستا و یا برخلاف هم بر جمعیت پروتوزوئرها عمل نماید. همچنین، تغییر اسمولاریته از معیارهای مهم دیگری است که بر غلظت همه میکروارگانیسم ها بخصوص پروتوزوئرها موثر می باشد. تغییر سریع اسمولاریته مایع شکمبه از حالت ایزوتونیک به حالت های هیپوتونیک و هیپرتونیک مرگ پروتوزوئرها را افزایش داده و تکثیر آنها را متوقف می کند. البته افزایش تدریجی فشار اسمزی و تغییر حالت ایزو به هیپرتونیک تاثیرات کمتری در مقایسه با هیپوتونیک خواهد داشت.

۳-۶-۵ اثرات بیرونی مخزن تخمیر بر جمعیت پروتوزوئرها

نتایج تعدادی از پژوهش ها نشان می دهد که علاوه بر اثرات خوراک و محیط شکمبه در غلظت پروتوزوئرها، میزبان، اقلیم و رفتار گونه های پروتوزوئری می تواند به شکل گسترده بر تراکم و حضور

گونه های آنها موثر واقع شوند. این فرضیه اولین بار توسط محققی به نام دوجیل (Dogiel) در ابتدای قرن بیستم براساس شناسایی خانواده افریواسکولکس در دام های مختلف پایه ریزی شده بود. در این فرضیه جمعیت پروتوزوئرها براساس گونه دام ها، اقلیم جغرافیایی و پراکنش گونه های پروتوزوئری مورد بررسی قرار گرفت.

- **اثر اقلیم و شرایط جغرافیایی؛**

کارشناسان بر این باورند که اثر گونه دامی و رفتار پروتوزوئری بر جمعیت پروتوزوئرها بیشتر از اثر اقلیم و شرایط جغرافیایی موثر خواهد بود. اما اختصاصاتی در این زمینه مشاهده می شود که نمی توان از آنها چشم پوشی کرد. همانگونه که تنوع جانوری و دامی براساس تنوع اقلیمی مشاهده می شود، باید انتظار داشت که تفاوتی بین میکروارگانیسم های موجود در مخزن شکمبه بخصوص پروتوزوئرها که به شدت به تنوع آب و هوایی وابسته می باشند دیده شود. بدین منظور محققین آزمایشات دامنه داری در اقلیم های متفاوت آغاز نمودند، تا بتوانند گونه های مشترک و متفاوت پروتوزوئری شکمبه را همراه با جمعیت آنها شناسایی کنند. در این زمینه نتایج تایید شده و هماهنگی حاصل شد (جدول ۲-۵). بطور مثال؛ گونه پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم در دام های اروپایی و آمریکای شمالی به فراوانی یافت می شود. اما در دام های آسیای جنوب شرق بخصوص دام های سیلان و هند و کشورهای اقیانوسیه مانند نیوزلند و در بعضی از کشورهای آمریکای جنوبی مانند برزیل و پرو یافت نشد. اما این سوال بر ذهن هر محققی خطور می کند که چگونه مناطق دور دنیا (مانند حضور انتودینیوم دالی در آلاسکا و ترکیه و یا بلفاروکروجرنسیس در آفریقا و برزیل) می توانند دارای گونه های یکسان پروتوزوئری شوند؟ برای ای سوال دو راه متفاوت ارائه شده است که همچنان جای تحقیق دارد. راه اول بیشتر برای دام های وحشی در مقایسه با دام های اهلی مصداق دارد. عده ای از کارشناسان بر این باورند که اگر چه انشقاق قاره ها توانسته گونه های مختلف جانوری را رقم بزند، اما به دلیل تکثیر سریع و گسترده، قرار گرفتن پروتوزوئرها در محیط نیمه بسته شکمبه با تغییرات کم و الگوی مصرف تقریبا ثابت آنها این شباهت ها همچنان حفظ شده است. اما راه دوم برای گونه های اهلی مصداق دارد. در راه دوم کارشناسان بر این باورند که اختلاط شدید دام های اهلی در جهان (به دلیل انتقال نژادهای اصیل به تمامی نقاط دنیا)، انتقال گسترده مواد غذایی مصرفی از یکسری کشورهای خاص به نقاط مختلف دنیا مانند علوفه و اقلام غله ای و تقریبا یکسان شدن جیره های مصرفی تنوع پروتوزوئرها در بین دام های اهلی کاهش یافته است. با این وجود کارشناسان به دلیل دست نخورده بودن گونه های وحشی و منطبق بودن خوراک آنها با منطقه آب و هوایی آزمایشات اثر اقلیم و شرایط جغرافیایی بر جمعیت پروتوزوئرها را بر روی آنها مفیدتر می دانند.

تحقیقات نشان می دهد که همه گونه های پروتوزوئری ثابت در شکمبه در اکثر دام های اهلی از لحاظ تعداد گونه یکسان دیده می شود. اما گونه های هلوتریش دارای تنوع حضوری بیشتری براساس شرایط اقلیمی هستند. اگر چه الگوی مزبور در این زمینه همچنان تهیه نشده و آزمایشات ادامه دارد اما تقریبا به دلیل بزرگ تر بودن اندازه گونه های پروتوزوئری در راسته انتودینومورف ها و خصوصیات شکارگری پروتوزوئر در شکمبه این گروه گستردگی بیشتری به خاطر غالب بودن دارد.

علاوه بر موارد فوق اقلیم های آب و هوایی می توانند بر جمعیت گونه های پروتوزوئری موثر واقع شود (جدول ۲-۵). آزمایشات ارائه شده نشان می دهد که جمعیت پروتوزوئرها (در دام های اهلی و وحشی) در فصول سرد سال کاهش یافته و در ماه های گرم سال افزایش می یابند. این افزایش می تواند ناشی از تغییر جیره غذایی و دمای شکمبه (براساس آب آشامیدنی) باشد. تنها گونه انتودینیوم آنترونوکلاتوم (*E. anteronucleatum*) روند معکوس را طی می نماید.

جدول ۲-۵ اثر گونه های دامی و شرایط جغرافیایی بر جمعیت و گونه های پروتوزوئری.

ردیف	میزبان و محل نگهداری	کل پروتوزوئرها ($\times ۱۰^{-۴}$) در هر میلی لیتر مایع شکمبه	تعداد گونه های پروتوزوئری
۱	بوفالوها		
	تایلند	۰/۷ (۰/۲ - ۲)	۸ - ۲۰
	مالزی	۱۲/۶ (۱۲/۳ - ۱۳)	۱۳ - ۱۴
	برزیل	۲۲/۹ (۱۶/۶ - ۳۵/۸)	۲۲ - ۳۵
	اکیناوا	۳۷/۴ (۲۷ - ۴۹/۵)	۷ - ۱۲
	فیلیپین	۴/۷ (۱/۵ - ۷/۸)	۷ - ۹
۲	گاوهای زبو		
	تایلند	۷/۱ (۰/۶ - ۳۱/۶)	۱۴ - ۳۹
	فیلیپین	۱۵/۸ (۱۳/۲ - ۱۸/۱)	۱۸- ۲۲
	مالزی	۱۱/۶ (۹/۸ - ۱۳/۴)	۱۲ - ۱۳
	برزیل	۲۶/۴ (۹ - ۵۱/۲)	۲۲ - ۳۶
	کنیا	۱۲/۹ (۲/۵ - ۳۹/۸)	۲۷ - ۴۵
۳	گاوهای هلشتاین		
	کانادا	۶/۹ (۲/۵ - ۱۲/۶)	۱۴ - ۲۴
	ژاپن	۱۳/۵ (۰/۵ - ۳۹/۸)	۴ - ۲۵

برگرفته از؛ Imai (1995,1989,1985), Shimizo (1983), Dehority (1979), Ito (1990)

همچنین در مناطق خشک جمعیت پروتوزوئرهای شکمبه به طور معنی داری از مناطق مرطوب بیشتر دیده می شود. علت این مسئله اگر چه با ایراداتی همراه است اما می تواند ناشی از فعالیت پایدار شکمبه به دلیل مصرف علوفه و افزایش فعالیت های هضمی فیبر توسط باکتری ها باشد.

- **اثر رفتارهای پروتوزوئری؛**

اگر چه تاثیر گونه های پروتوزوئری بر یکدیگر به صورت اصلی مسلم در نیامده است، اما ظاهرا بین گونه های موجود در مخزن تخمیر یک حالت رقابتی و مشارکتی مشاهده می شود. این رفتارها سبب کاهش یا افزایش گونه های موجود در شکمبه شده و رشد پروتوزوئرها را تحت تاثیر قرار می دهد. بطور مثال؛ گونه پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم بر متادینیوم ها، انتودینیوم ها، الیترو پلاسترون ها، انوپلوپلاسترون ها، استراکودینیوم ها، اپیدینیوم ها و یودیپلودینیوم ها غالب بوده و در صورت ورود گونه پلی پلاسترون مذکور به محیط شکمبه جمعیت پروتوزوئری از پروتوزوئرهای فوق به پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم تغییر خواهد نمود. و یا گونه اپیدینیوم بر افریواسکولکس غالب بوده و در صورت مایه کوبی هر دو گونه در شکمبه تراکم پروتوزوئری به سمت افزایش اپیدینیوم و کاهش افریواسکولکس پیش می رود. اما یک سئوال اساسی در این زمینه وجود دارد که چه عاملی توانسته یک گونه را بر گونه دیگر غلبه دهد؟ محققین برای این پرسش فرضیات مختلفی ارائه نموده اند که رقابت بر سر خوراک، تغییر جمعیت باکتریایی، انتشار مواد محدود کننده از گونه های در حال رشد یا تخریب و شکار شدن گونه ها توسط گونه های غالب از آن دسته محسوب می شود. اما فرضیه شکار بر پایه و اساس محکم تری بنا شده و تایید کننده آزمایشات انجام گرفته می باشد. محققین ثابت نموده اند که احتمال حضور گونه های بزرگتر مقابل گونه ها کوچکتر در مایه کوبی های انجام شده بیشتر است. این آزمایش – که بواسط ایجاد گرسنگی در کشت های مخلوط پروتوزوئری طراحی شده است – می تواند ادعای شکارگری گونه بزرگ و مغلوب بودن گونه کوچکتر و همچنین هم نوع خواری را اثبات نماید.

- **اثر میزبان بر پروتوزوئرها؛**

اگر چه فهرستی از آزمایشات اثر میزبان بر جمعیت گونه های پروتوزوئری دیده می شود، اما اتفاق نظر در این زمینه کمتر حاصل شده است. بطور مثال؛ محققان دریافته اند که جنس افریواسکولکس که متعلق به گاوان و شترسانان می باشد، به سختی در بزها و گوسفندهای جوان مشاهده می شود (جدول ۳-۵). حتی حضور این جنس در دام های بالغ تر گوسفند و بز هم بسیار ناپایدار است. اما دسته ای دیگر از تحقیقات نشان می دهد که جنس افریواسکولکس در گونه های جانوری گوسفند و بز با تراکم متوسط دیده می شود. و یا در آزمایشی دیگر محققین دو گروه از پروتوزوئرها را در گوسفندان مایه کوبی نمودند که گروه اول (انتودینیوم ها، ایزوتریشیداها و انتودینیومورف های بزرگ) بر گروه دوم

(انتودینیوم ها، ایزوتریشیداها، یودیپلودینیوم ها، اپی دینیوم ها و انتودینیومورف های بزرگ) غالبیت بیشتری داشت. ولی حضور گونه های گروه دوم در شکمبه گوسفندان منتفی نبود.

جدول ۳-۵ تاثیر میزبان بر گونه های پروتوزوئری.

نام گونه پروتوزوئری	موش گیاه خوار	بوفالو	گاو	بز
Entodinium	+	+	+	+
Isotricha	+	+	+	+
Eodinium	-	+	+	-
Eudiplodinium	+	+	+	+
Enoploplastron	-	-	+	+
Epiplastron	-	-	+	-
Opisthrotrichum	-	+	-	-

اقتباس از: Ogimoto and Imai 1981.

لذا چه عاملی از میزبان می توانست در گسترش یک گونه پروتوزوئری در شکمبه موثر باشد؟ در این زمینه فرضیه های مختلفی ارائه گردیدکه مهمترین آن عامل فیزیولوژیکی دام (نوع و مقدار خوراک مصرف شده براساس ساختار دهانی و شکمبه ایی، کیفیت و کمیت بزاق تولیدی و سرعت ترقیق خوراک از شکمبه) می باشد. عامل فیزیولوژیکی به نوبه خود بر اسیدیته شکمبه، سرعت و گسترش تخمیر، فشارهای اسمولالیته و سرعت عبور مواد مغذی از شکمبه تاثیر می گذارد. هر یک از موارد فوق می تواند باعث گسترش یا حذف یک گونه پروتوزوئری باشد.

در کنار اثر میزبان بر جمعیت پروتوزوئرها لازم است اختصاصی بودن گونه جانوری مدنظر قرار گیرد. زیرا اختصاصی بودن میزبان می تواند به اختصاصی شدن پروتوزوئر منتج گردد. میزبان براساس شرایط فیزیولوژیکی خود نوعی از پروتوزوئر را به شکمبه تحمیل می نماید. پروتوزوئر می تواند در این راستا تخصصی عمل نموده و از گسترش سایر پروتوزوئرها براساس رقابت جهت مصرف مواد غذایی، انتشار مواد محدود کننده و شکارگری در حد وسیع جلوگیری نماید. مهمترین آزمایش در این زمینه مایع کوبی محتویات شکمبه گاو به بز بوده است. در این مایع کوبی مشخص گردید گونه های اپیدینیوم و افریواسکولکس قادر به فعالیت گسترده در بز نبوده و افت شدیدی داشتند. و یا فیزیولوژی دستگاه گوارش گوسفندان اجازه فعالیت به گونه یودیپلودینیوم را در حد وسیع نمی دهد و در عوض به گونه های پلی پلاسترون و افریواسکولکس اجازه گسترش داده است. مثال دیگر در این زمینه مایع کوبی محتویات شکمبه گوزن شمالی به گوسفندان است که هیچ گونه پروتوزوئری از گوزن در گوسفندان (بجز انتودینیوم اکسیگوم که توزیع گسترده ای در بین نشخوارکنندگان دارد) قادر به رشد نبود. لذا اختصاصی شدن پروتوزوئر به فعالیت های خوراکی و گوارشی میزبان به شدت وابسته خواهد بود.

میزبان علاوه بر جمعیت پروتوزوئرها می تواند به صورت کاملا اختصاصی بر توزیع پروتوزوئرها در دنیا موثر واقع شود. آزمایشات توزیع پروتوزوئرها (براساس میزبان) امروزه بیشتر بر روی دام های وحشی تمرکز یافته است. زیرا بررسی در زمینه توزیع پروتوزوئرهای اولیگوتریش و هلوتریش موجود در دام های اهلی ثابت شده است که بیشتر جنس های هر دو خانواده بجز کالواسکولکس، اپیستوتریکوم و اپی پلاسترون در اولیگوتریش ها و بوشلیا، چارونینا و اولیگوایزوتریشا در هلوتریش ها در تمامی دام های دنیا پراکنده شده است. البته تفاوت در گونه های پروتوزوئری دام های اهلی همواره دیده می شود که می تواند ناشی از نژاد خاص در یک گونه خاص باشد. مثلا نژاد پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم در گاو با گوسفند متفاوت است. اما در دام های وحشی توزیع پروتوزوئرها به دلیل مهاجرت های طولانی و تنوع زیستی گونه های مختلف در کنار همدیگر بسیار متفاوت تر و شاخص تر از دام های اهلی می باشد. بطور مثال؛ حضور انتودینیوم کوادریکوسپیس (*Entodinium quadricuspis*) قطبی در بین نشخوارکنندگان آفریقایی از این موارد می باشد.

۷-۵ اثر متقابل پروتوزوئرها با سایر میکروارگانیسم های شکمبه

از آنجا که پروتوزوئرها در کنار سایر میکروارگانیسم ها بخصوص باکتری ها و قارچ ها تشکیل دهندگان اصلی فعالیت های تخمیری در شکمبه می باشند، مطالعه اثرات متقابل آنها با یکدیگر برای حفظ تعادل تخمیر اهمیت دارد. برای بررسی بهتر اثر متقابل پروتوزوئرها با سایر میکروارگانیسم ها این روابط به دو بخش عمده اثر متقابل با یوکاریوت ها (پروتوزوئرها با قارچ ها و هم نوع خود) و اثر متقابل با پروکاریوت ها (پروتوزوئرها با باکتری ها) تقسیم می شود.

۱- اثر متقابل پروتوزوئرها با باکتری ها؛ مشهودترین روابط موجود در این بخش رابطه شکارگری مژک داران با باکتری ها می باشد. اگر چه در این بخش روابط همزیستی و انگلی هم مشاهده می شود. باکتری های غوطه ور در محتویات شکمبه پس از آنکه توسط پروتوزوئرهای شکمبه به صورت انتخابی بلعیده شدند، در واکوئل های گوارشی هضم می شوند. قابلیت شکارگری پروتوزوئرها سبب تعادل میکروبی و کنترل تخمیر شکمبه ای می شود. به مصرف رسیدن باکتری ها توسط پروتوزوئرها به تعداد باکتری های قابل دسترس، ظرفیت گوارشی پروتوزوئرها و اثر بخشی سایر مواد مغذی (هر چقدر مواد مغذی در دسترس باشد، باکتری ها کمتر شکار می شوند) دارد.

از لحاظ ظاهری باکتری ها گاه بر روی سطح سلول پروتوزوئر و گاه در سیتوپلاسم آنها مشاهده می شوند. علت تماس باکتری با سطح پروتوزوئر می تواند ناشی از بدام افتادن باکتری و یا فعالیت هماهنگ آنها با هم (مشارکتی) رخ داده باشد. همچنین، قرار گرفتن باکتری در سیتوپلاسم می تواند نوعی زندگی

انگلی و یا همزیستی را در پی داشته باشد. فرضیه های ارائه شده در این زمینه دارای مجهولات فراوانی است. اما مهمترین فرضیه ارائه شده مربوط به ارتباط باکتری با واکنش های متابولیسمی پروتوزوئرها می باشد. بدین معنی که باکتری های متان زا مانند متانوباکتریوم بارکری با فعالیت انتقال هیدروژن در سیتوپلاسم پروتوزوئرهای تولید کننده متان در بعضی از جنس های انتودینومورف و جنس ایزوتریشیدا هماهنگی کاملی دارند. از فعالیت های مشارکتی باکتری ها و پروتوزوئرها در سطح سلول می توان به تولید متان بصورت همزمانم و یا هضم سلولاز توسط باکتری های فیبروباکتر سوکسینوژنز، رومینوکوکوس فلاوفاسینس، رومینوکوکوس آلبوس و بوتیرویبریو فیبروسولونس با پروتوزوئرهای پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم، انوپلاسترون تریلوریکاتوم، دیپلودینیوم و یودیپلودینیوم اشاره کرد.

۲- اثر متقابل پروتوزوئرها با قارچ ها؛ مشاهدات میکروسکوپی نشان می دهد ارتباطات پروتوزوئر با قارچ ها مداوم و همواره دارای کلونی های همزیست به دلیل آزاد سازی خوراک توسط هر دو طرف می باشند. رابطه مشارکتی هضم فیبر توسط فعالیت های توام پروتوزوئر با قارچ ها همیشه قابل دیدن است. بطور مثال؛ پروتوزوئرهای هلوتریش بخصوص ایزوتریشیداها بدون حضور قارچ نئوکالیماستیکس فرونتالیس (*Neocalimastix frontalis*) قدرت هضم سلولز و زایلولوز را نخواهند داشت. البته مدارکی هم موجود است که نشان می دهد بین این دو میکروارگانیسم روابط شکارگری توسط پروتوزوئرها وجود داشته است. از آنجا که اندازه زئوسپور قارچ ها (مرحله هاگ تاژک دار) مشابه باکتری ها بوده، همراه با ریزوئیدشان مورد حمله پروتوزوئرها قرار می گیرد. بطور مثال؛ پلی پلاسترون مولتی وسیکولاتوم، یودیپلودینیوم مگی و گونه های انتودینیومی قادر به هضم زئوسپور و ریزوئیدها هستند. قدرت آنزیمی دسته ای از پروتوزوئرها مانند ایزوتریشیداها آنقدر بالا است که می توانند کیتین قارچ ها را هضم و محلول نمایند. با این وجود ارتباطات پروتوزوئرها با قارچ ها آنقدر تنگاتنگ می شود که گاهی طبقه بندی گروه های تاژک دار به دلیل شباهت فراوان با قارچ ها دچار اشکال می گردد.

۸-۵ برای مطالعه بیشتر

- Abou A. R., H. Howard. (1962). The biochemistry of rumen protozoa. Biochem. J. 83: 313.
- Ankrah, P., S. C. Loerch, B. A. Dehority. (1990). Sequestration, migration and lysis of protozoa in the rumen. J. G. Microbiology, 136: 1869-1875.
- Bauchop, T., R. T. J. Clarke. (1976). Attachment of the ciliate epidinium Crawley to plant fragments in the sheep rumen. Appl. Environ. Microbiol. 32:417-422.

- Bhatiab, L. (1936). The fauna of British India. Protozoa-cilbphora. London: Taylor and Francis.
- Bryant, M. P. (1977). Microbiology of the rumen. Cornell University Press, Ithaca, N. Y.
- Church, D. C. (1988). The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall.
- Corliss J. O. (2000). Biodiversity, classification, and numbers of species of protists. In: Raven P. H., Williams, T. (Eds) Nature and human society. The quest for a sustainable world. National Academy Press, Washington, pp: 130–155.
- Coleman, C. S. (1978). Rumen entodiniomorphid protozoa: Methods of cultivating parasites in vitro (Ed A. E. R. Taylor & J. R. Baker) pp: 39-54 Academic Press: London.
- Cronje, P. B. (2000). Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction. Cabi publishing, ISBN 0 85199 4636.
- Dehority, B. A. (2003). Rumen microbiology. Nottingham University Press. ISBN 1 897676 99.
- Dehority, B. A. (1993). Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Dini F, D. Nyberg. (1993). Sex in ciliates. In: Jones J. G. (Ed). Advances in microbial ecology, vol 13, Plenum press, New York, pp 85–153.
- Foissner, W., A. Chao, L. A. Katz. (2007). Diversity and geographic distribution of ciliates. Springer. Biodivers Conserv. S 10531 007 9254 7.
- Gocmen, B., B. A. Dehority, G. H. Talu, S. Rastgeldi. (2001). The rumen ciliate ophryoscolecid and isotrichid fauna of domestic sheep from the Turkish republic of northern Cyprus. J. Eukaryot. Microbial, 48: 455-459.
- Gocmen, B., B. A. Dehority, S. Rastgeldi. (2003). Ciliate protozoa in the rumen of Turkish domestic cattle. J. Eukaryot. Microbial, 50: 104-108.
- Hespell, R.B., D.E. Akin, B.A. Dehority. (1997). Bacteria, fungi and protozoa of the rumen. International Thompson Press, New York.
- Hobson, P. N. (1989). The rumen microbial ecosystem, Elsevier Applied Science, London.
- Hobson, P. N., C. S. Stewart. (1997). The rumen microbial ecosystem. 2ed. Chapman & Hall, Suffolk, UK. ISBN 0 7514 0366 0.
- Hungate, R. E., M. P. Bryant, R. A. Mah. (1964). The rumen bacteria and protozoa. Annual Review of Microbiology 18: 131-166.

- Hungate, R. E. (1975). The rumen microbial ecosystem. Annual Review of Ecology and Systematics 6: 39-66.
- Hungate, R. E. (1966). The rumen and its microbes. London: Academic Press.
- Kurihara, Y., J. Margaret, P. N. Hobson, S. O. Mann. (1968). Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the sheep rumen. J. gen. Microbiol, 51: 267-288.
- Margaret, J. (1962). Inter -Relationships between certain rurnen ciliate protozoa. J. Gen. Microbiol, 29: 579-588.
- McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, K. J. Cheng. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72: 3004–3018.
- Ogimoto, K., S. Imai. (1981). Atlas of rumen microbiology. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- O’Neil, R. H., R. H. Lilien, B. R. Donald, R. M. Stroud, A. C. Anderson. (2003). Phylogenetic classification of protozoa based on the structure of the linker domain in the bifunctional enzyme, dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. J. Biological Chemistry. pp. 52980–52987.
- Orpin, C. G., A. J. Letcher. (1978). Some factors controlling the attachment of the rumen holotrich protozoa lsotricha intestinalis and 1. Prostoma to plant particles in vitro. J. G. Microbiology 106:33-40.
- Orpin, C. G., S. D. Mathiesen. (1986). Microcetus lappus gen. nov., sp. nov.: New species of ciliated protozoon from the bovine rumen. Environmental Microbiology, p: 527-530.
- Potter, E. L., B. A. Dehority. (1973). Effects of changes in feed level, starvation, and level of feed after starvation upon the concentration of rumen protozoa in the ovine. J. Microbiology. pp: 692-698.
- Roth, L. E., Y. Shigenaka. (1964). The structure and formation of cilia and filaments in rumen protozoa. J. Cell biology. pp: 249.
- Russell, J. B. (2002). Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca, N.Y.
- Struder-kypke M. C., A. G. Wright, S. I. Fokin. (2000). Phylogenetic relationships of the genus paramecium inferred from small subunit rRNA gene sequences. Mol Phylogenet Evol 14: 122–130.
- Towne, G., T. G. Nagaraja. (1989). Occurrence and diurnal population fluctuations of the ruminal protozoan microcetus lappus. Environmental Microbiology, p: 91-94.
- Towne, G., T. G. Nagaraja, K. K. Kemp. (1988). Ruminal ciliated protozoa in bison. Appl. Environmental. Microbiology. 54:2733-2736.

- Varga, G. A., E. S., Kolver. (1997). Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. J. Nutritional Sciences. p: 819-823.
- Williams, A. G., G. S. Coleman. (1992). The rumen protozoa. Springer-Verlag, London. pp: 441.
- Williams, A. G. (1986). Rumen holotrich ciliate protozoa. Microbiol Reviews, p: 25-49.

فصل ششم

قارچ های شکمبه

۱-۶ تکنیک های شناسایی قارچ ها	۲۵۶
۲-۶ روش های مطالعه قارچ های شکمبه	۲۵۹
۳-۶ طبقه بندی قارچ های شکمبه	۲۶۴
۴-۶ چرخه زندگی قارچ های شکمبه	۲۷۰
۵-۶ ساختمان شیمیایی قارچ ها	۲۷۵
۶-۶ فعالیت تخمیری قارچ ها	۲۷۷
۷-۶ جمعیت قارچ ها	۲۸۵
۸-۶ اثر متقابل قارچ ها با سایر میکروارگانیسم های شکمبه	۲۸۹
۹-۶ برای مطالعه بیشتر	۲۹۴

قارچ های شکمبه

نشخوارکنندگان برای سلامتی فعالیت های شکمبه علاوه بر باکتری ها و پروتوزوئرها به قارچ های بی هوازی اختیاری و بی هوازی نیازمند می باشند (جدول ۱-۶). اما بحث قارچ شناسی و فعالیت های تخمیری آن در شکمبه یک بحث جدید و از اواخر قرن بیستم رایج گردیده است.

جدول ۱-۶ تاثیر حذف گونه های قارچی از شکمبه گوسفند.

اطلاعات	گروه شاهد	گروه بدون قارچ
مصرف (گرم در روز)		
ماده آلی	۸۷۷ ± ۵۲/۶	۶۲۸ ± ۳۶/۴
ADF	۳۷۳ ± ۲۲/۶	۲۶۴ ± ۱۶/۴
قابلیت هضم (درصد)		
ماده آلی	۵۷/۳ ± ۱/۰۲	۵۰/۳ ± ۱/۳۸
ADF	۵۵ ± ۱/۶۴	۴۶/۵ ± ۱/۲۸
اسیدیته شکمبه	۶/۶ ± ۰/۰۷	۷ ± ۰/۰۵
آمونیاک شکمبه (میلی گرم نیتروژن در لیتر)	۳۲ ± ۹/۰	۵۰ ± ۱۰/۸
کل اسیدهای چرب شکمبه (میلی مول)	۷۸ ± ۲/۴	۵۵ ± ۱۰/۸
تناسب مولار		
استیک	۰/۷۲	۰/۵۶
پروپیونیک	۰/۱۹	۰/۳۴
بوتیریک	۰/۰۷	۰/۰۷
اسیدهای چرب شاخه دار	۰/۰۲	۰/۰۳
قارچ های بی هوازی		
شکمبه ($10^3 \times$ زئوسپور در هر میلی لیتر)	۱۹ ± ۵/۷	-
مدفوع ($10^3 \times$ زئوسپور در هر گرم)	۱۱ ± ۵/۶	-
باکتری (سلول در هر میلی لیتر)		
کل میکروب ها ($\times 10^9$)	۱/۶ ± ۰/۳۳	۱/۴ ± ۰/۳۷
سلولاليتيک ($\times 10^8$)	۱/۱ ± ۰/۲۹	۲/۶ ± ۱/۴۸
پروتوزوئرهای مژک دار		
$10^5 \times$ سلول در هر میلی لیتر	۴/۸ ± ۰/۴۹	۳ ± ۰/۵۳

اطلاعات از گوردون و فیلیپس ۱۹۹۳.

قارچ ها در اوایل تحقیقات میکروبی شکمبه به دلیل تاخیر در جداسازی قارچ ها از شکمبه و قرارگیری آنها در مرحله زئوسپور به عنوان شبه پروتوزوئر طبقه بندی شوند. اما نهایتا تفاوت در نحوه

فعالیت های تخمیری و تولیدات قارچ ها همراه با وضعیت ساختمانی آنها کارشناسان را مجاب نمود تا حضور آنها را به صورت مجزا پذیرا باشند. قارچ ها برای فعالیت های تخمیری شکمبه ضروری هستند. لذا در شکمبه دام های تازه متولد شده به دلیل فقدان فعالیت های تخمیری حضور نخواهند داشت. استقرار این گونه زیستی در شکمبه بیشتر براساس خوراک، آب و تماس با دام های بالغ تر (از طریق لیسیدن و حتی تنفس) می باشد. از آنجا که امکان انتقال قارچ ها از طریق هوا به کمک هاگ های تولید شده وجود دارد، محققین زمان استقرار دائمی قارچ ها را در شکمبه سریع فرض می کنند. قارچ ها از انتهای هفته اول بعد از تولد ظاهر می شوند. در صورت مصرف علوفه توسط دام جوان استقرار قارچ ها سریع تر و جمعیت آنها گسترده تر خواهد شد. مصرف مواد متراکم و پر نشاسته جمعیت قارچی را به دلیل افت شدید اسیدیته کاهش و حتی به حذف کامل سوق می دهد. بین قارچ ها و پروتوزوئرها یک رابطه منفی مشاهده شده است که اهمیت ویژه ای در دستکاری های میکروبی شکمبه خواهد داشت. در نگاه اولیه می توان گفت با غیبت این تک سلولی ها هضم خوراک های خشبی- علوفه ای و سلامت محیط شکمبه کاهش یابد.

قارچ ها تنها میکروارگانیسم های غیر فتوسنتزی بشمار می آیند که دیواره سلولی آنها در مرحله نباتی کیتین و سلولز مشاهده می شود. براساس همین ساختار می توان به طور مطلوب تر آنها را از پروتوزوئرها تشخیص داد. البته در کنار این معیار مواردی چون وجود تارهای ریزوئید، مقاومت در برابر شرایط محیطی و نوع تولیدمثل می تواند در شناسایی بهتر آنها کمک نماید. تعداد قارچ ها در شکمبه معمولا برپایه خوراک (خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها) و نژاد دامی متغیر ($۱۰^{۳}$-$۱۰^{۵}$ در هر میلی لیتر) و در شمارش مستقیم مشخص گردیده است که جمعیت قارچی بین ۲۵-۸ درصد از توده زنده میکروبی خواهد بود. برآورد دقیق قارچ در شکمبه همچنان ناممکن نمی باشد. پیشرفت های اخیر در اندازه گیری های اولیگونوکلوتیدی ممکن است تخمین دقیق تری از توده قارچی شکمبه ارائه دهد.

۱-۶ تکنیک های شناسایی قارچ ها

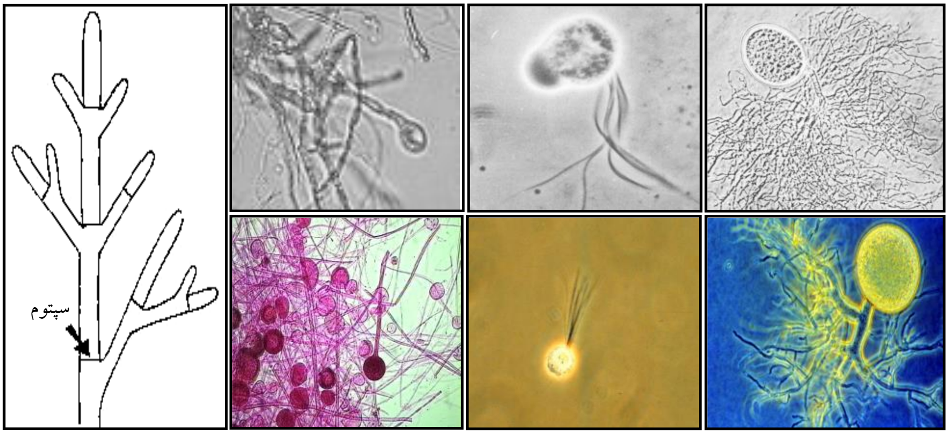
قارچ شناسی در اصل به معنای شناخت تک سلولی های غیرفتوسنتز کننده (به دلیل فقدان کلروفیل) که حاوی ساختار گیاهی هستند، می باشد. این تکنیک اولین بار توسط پیرآنتونیو میچلی در قرن هجدهم پایه گذاری شده است. معمولا در جهت شناسایی قارچ ها از دو شیوه مرسوم ریخت شناسی سلولی (بیشتر براساس کشت و مشاهدات کلونی) و سپس تکنیک های ملکول زیستی (مانند درخت فیلوژنی) صورت می گیرد. در تکنیک های زیستی ملکولی استفاده از مقدار بازهای آدنین به علاوه گوآنین، سیتوزین و تیمیدین (C+A+T+G) و ترکیبات خارج سلولی همراه با توالی های نوکلوتیدی rRNA

در زیر واحدهای S ۲۸ + S ۵/۸ + S ۱۸ می توان به طبقه بندی و شناسایی قارچ ها پرداخت. قارچ ها جزء خانواده یوکاریوتیک های تک سلولی می باشند، که به قلمرو آغازیان تعلق دارند. قارچ ها همانند پروتوزوئرها از نظر ساختمان دارای تفاوت فاحشی با یکدیگر هستند. عده‌ای از آنها بخشی از فلور طبیعی بدن جانداران بخصوص دسته نشخوارکنندگان را تشکیل می‌دهند. معمولا شناسایی قارچ ها براساس خصوصیات ریخت شناسی سلولی و سپس تکنیک های ملکول زیستی انجام می گیرد. اما شیوه های مانند اشکال پراکنش جمعیت و فعالیت های زیستی هم می تواند در شناسایی آنها مهم تلقی شوند.

براساس تکنیک های تشخیصی، محققین ساختار تشکیلاتی قارچ ها در حالت نفوذ با بافت های گیاهی را به سه قسمت مشخص و اصلی تقسیم می کنند. (۱) دیواره سلولی؛ که بسیار شبیه به دیواره سلولی گیاهان می باشد. در این بخش کیتین و سلولز کاملا قابل مشهود است. کیتین عامل اصلی تفاوت قارچ ها با پروتوزوئرهای تاژک دار می باشد. در بعضی از نقاط پوست در قارچ ها خواص نیمه تراوا با خاصیت انتخابی مشاهده می گردد. (۲) سیتوپلاسم که به دو ناحیه خارجی (اکتوپلاسم) و داخلی (آندوپلاسم) تقسیم می شود. بخش داخلی؛ دارای ضمائمی است که منطبق با شرایط زیستی قارچ می باشد. شبکه آندوپلاسمی که از دو غشای موازی هم تشکیل شده اند، در سلول های جوان مشخصا دیده می‌شود ولی در سلول های مسن‌تر جزئی و کم بوده و یا ممکن است قابل رویت نباشد. ریبوزوم ها نیز وجود داشته و پراکنده در سیتوپلاسم سلولی می‌باشند. وجود میتوکندری از شاخصه های مهم این میکروارگانیسم ها محسوب می شود. علاوه بر اندامک های فوق دستگاه گلژی نیز وجود داشته و از واحدهای دیکتیوزومی تشکیل می‌یابد. واکوئل ها در سلول های جوان به تعداد زیاد و در سلول های مسن تر به تعداد کم ولی اندازه بزرگتر دیده می‌شود. مواد ذخیره ای در سلول های قارچی عمدتا در فرم گلیکوژن و چربی می‌باشد. بخش خارجی؛ شفاف، گاهی با ضمائم و بدون ضمائم که مسئولیت جذب و ترشح سلولی را به عهده دارد، مشاهده می گردد. و (۳) هسته که دارای غشاء، شیره مخصوص، کروموزوم و هستک می باشد. عده ای از گزارشات ارائه شده بعضی از قارچ ها را دارای بیش از یک هسته می دانند که می تواند مربوط به مرحله زئوسپور باشد. محل قرارگیری هسته در بخش مرکزی سلول بوده و گاه در بخش میسیلیوم ها دیده می شوند. غشای هسته در قارچ ها دو لایه و حاوی منافذ ریزی است. به هنگام تقسیم میتوز، غشای هسته ناپدید نمی‌گردد و هستک ها نیز به هنگام تقسیم باقی می مانند. ولی در هنگام تقسیم میوز غشای هسته و هستک ها کاملا ناپدید می‌گردند.

تشکیلات قارچ ها بجز ساختار ارائه شده در باب اندام شناسی در حالت کامل (تالوس) به سه بخش زئوسپور، ریزوئید (ریزومیسیلویم ها) و اسپورانجیوم که به دو بخش مونوسنتریک و پلی سنتریک هست، تقسیم می شود (شکل ۱-۶). زئوسپورها در داخل اسپورانجیوم بالغ شده و از آن خارج می گردند. به هر

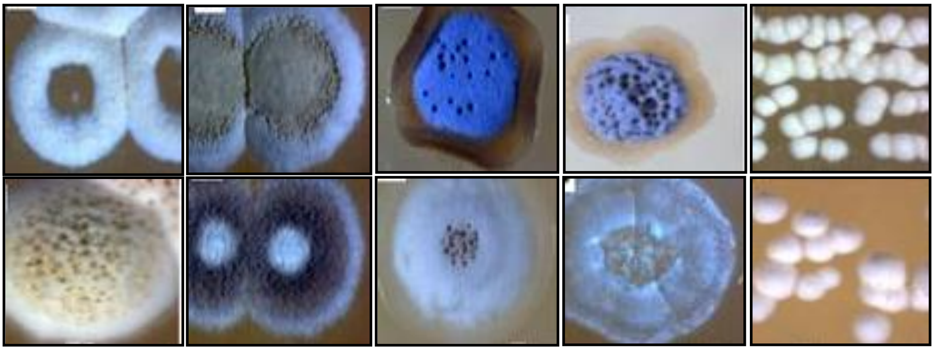
حال شکل سلولی قارچ ها در دوره های خاصی از زندگی آنها تقریبا ثابت است. این ثبات در شکل به عقیده اکثر محققین مدیون پوست ضخیم سلول در مراحل مشخص زیستی می باشد. بطور مثال؛ اشکال هاگ یا زئوسپورها (با اندازه متغیر از ۱۷۰-۳۹ میکرومتر) همواره ثابت و بصورت گلوبولی، کروی، تخم مرغی و گرد تا بیضی مشخص می شوند. همچنین وجود ساقه تندش (Germtube) (کوتاه، بلند و نامنظم) و یا فقدان آن در قارچ می تواند از تفاوت های ریخت شناسی تلقی شود. پس از آنکه زئوسپورهایی با قطر ۶ تا ۱۲ میکرومتری به مواد غذایی چسبید، ریزوئیدها شروع به رشد و تا ۲۰۰-۱۷۰ میکرومتر افزایش می یابند. در اکثر قارچ ها اندام رویشی ریزوئید از ساختمان لوله ای به نام هیف (Hyphes) یا ریسه تشکیل شده است. ریسه ها شفاف و میکروسکوپی اند. قطر آنها متغیر و در جهات مختلف رشد می کنند. رشد اصلی ریسه از بخش انتهایی آن انجام می‌گیرد. به مجموعه ریسه ها میسیلیوم اطلاق می‌گردد. در ریسه های دیواره دار دیواره عرضی دیده می شود که به سپتوم (Septum) شهرت دارند (شکل ۱-۶). این دیواره می تواند متخلخل و یا کامل باشد. دو نوع دیواره عرضی در ساختمان ریسه های دیواره دار (Septatehypha) قابل تشخیص است: (۱) دیواره اصلی: که همزمان با تقسیم سلولی تشکیل می‌گردد. (۲) دیواره نابجا: که به تقسیم سلولی مربوط نبوده و ممکن است در محل آسیب دیدگی برای ترمیم بافت ایجاد گردد. و یا برای جدا کردن بخش مسن ریسه از بخش جوان و یا برای تشکیل اندام‌های زایشی این دیواره ایجاد گردد.



شکل ۱-۶ اشکال مختلف قارچ ها در شکمبه؛ اسپورانجیوم سمت راست، زئوسپور با تاژک در وسط و ریزوئیدها همراه با سپتوم در سمت چپ.

اشکال این گروه از میکروارگانیسم ها در هنگام توسعه اندام رویشی متغیر و شکل ثابتی در کشت های آنها مشاهده نمی گردد (شکل ۲-۶). اشکال مشاهده شده در کشت های قارچی بیشتر نامنظم،

گرد، سرسوزنی، کروی تا برآمده، چندضلعی و بیشتر پنج ضلعی، تخم مرغی شکل و حتی به شکل پرتوهای کوچک گرانوله می باشد. اندازه های بدست آمده در کشت ها به شدت به حضور مواد مغذی وابسته می باشد. اما اندازه تقریبی آنها از شعاع ۴ میلی متر تا ۵ سانتی متر تعیین شده است. همچنین، در مطالعات ریخت شناسی محققین به دو شکل ظاهری خاص در رویش پی بردند که می تواند مبنای مناسبی برای طبقه بندی محسوب شود. این دو حالت رویش چند قطبی و تک قطبی است که می تواند کشت قارچی و شکل آن را تحت تاثیر قرار دهد.



شکل ۲-۶ اشکال کلونی قارچ های بی هوازی شکمبه.

در بخشی از چرخه زندگی قارچ ها (مرحله زئوسپور) تاژک مشاهده می شود. تاژک هایی با اندازه متغیر گاه تا ۴۰ میکرومتر عامل حرکتی مهم در انتشار زئوسپورها محسوب می گردد. به خاطر وجود تاژک در زئوسپورها محققین اشتباهات اساسی در زمینه طبقه بندی آنها بعنوان پروتوزوئرهای تاژک دار نشان دادند. تعداد تاژک ها در این تک سلولی ها متغیر و بین صفر تا ۲۰ عدد در هر زئوسپور قابل تغییر است. خصوصیات ساختمانی تاژک در قارچ ها همانند تاژک سایر میکروارگانیسم ها می باشد. تفاوت عمده تاژک در قارچ ها با سایر میکروارگانیسم ها جدا شدن آن پس از اتصال زئوسپور به مواد غذایی بخصوص فیبرها می باشد.

۲-۶ روش های مطالعه قارچ های شکمبه

جهت بررسی وضعیت قارچ های شکمبه لازم است پراکنش و شکل زندگی آنها تعیین و رسیدگی های مربوط به آن صورت گیرد. تعیین هویت قارچ ها به دلیل گستردگی و تا حدی پیچیدگی های زندگی، سخت و تقریبا شناسایی همه آنها در حال حاضر غیر ممکن به نظر می رسد. با همه سخت بودن روش تعیین هویت، محققین روش های زیادی را در این زمینه براساس امکانات آزمایشگاهی ارائه نمودند. برای همسان سازی و بهبود مطالعات قارچ شناسی لازم است یک روش ساده و در عین حال با

دقت بالا مشخص تا همه پژوهشگران از آن استفاده نمایند. با بکارگیری تکنیک های یکسان می توان قیاس واقعی بین پژوهش ها انجام داد.

۱-۲-۶ کشت قارچ های بی هوازی

تولید کشت یکی از مباحث اصلی و در حال تغییری است که در مطالعات قارچ شناسی بی هوازی همانند سایر میکروارگانیسم های شکمبه موثر می باشد. کشت های تهیه شده قارچی در لوله ها و پتری دیش های کاملا سر پوشیده قرار می گیرد. محیط کشت های تهیه شده می تواند ترکیبی یا غیر ترکیبی، با مواد کربنی محلول و غیر محلول همراه با گازهای دی اکسیدکربن (۱۰۰ درصد) و یا مخلوطی از گاز دی اکسیدکربن و نیتروژن (۷۰ به ۳۰) تهیه شده باشند. مکانیسم تهیه کشت های لازم برای پرورش قارچ ها همانند باکتری ها می باشد. کشت های قارچی ترکیبی از مایع شکمبه و سایر موادی است که با هم آمیخته و نگهداری می شود. این کشت ها دارای ترکیباتی مانند بافرهای فسفات و بی کربنات، عامل های شیمیایی مانند سولفید سدیم و سیستئین هیدروکلراید، رزازورین که شاخص پتانسیل ردوکس می باشد، است. برای خروج هوا از محیط کشت لازم است مواد مخلوط شده را در ظروف حاوی دی اکسیدکربن و نیتروژن جوشانده و اکسیژن آزاد آن را خارج نماییم. روش کار سیرینگ و ندل (Syringe and Needle) ساده ترین روش کار تهیه ژل جهت کشت قارچ بی هوازی می باشد. در این شیوه برای تهیه منبع کربنی محیط کشت می توان از ۴ تا ۵/۵ گرم در لیتر کاه گندم یا برنج آسیاب شده استفاده نمود و برای منبع انرژی از سلوبیوز و گلوکز بهره جست. مایع شکمبه بکار رفته در ساخت محیط کشت از طریق صاف کردن و سانتریفوژ نمودن (در چهار درجه سانتی گراد با g ۲۵۰۰۰ در ۳۰ دقیقه) محتویات شکمبه که از فیستولای دام بدست می آید، تهیه می گردد (برای نگهداری مایع شکمبه دمای ۲۰- درجه سانتی گراد لازم است). محلول های نمکی مورد استفاده در کشت های بی هوازی شامل دو گروه عمده است که شامل:

- محلول شماره I؛ ۳ گرم K_2HPO4 را با ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل می کنیم.
- محلول شماره II؛ ۳ گرم K_2HPO_4، ۶ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۶ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۶ گرم $CaCl_2.2H_2O$ و ۶ گرم نمک را در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل می کنیم. در هنگام مخلوط کردن عناصر سازنده در محلول باید همه نمک ها یک به یک حل شوند. برای نگهداری هر دو محلول لازم است دمای ۴ درجه سانتی گراد فراهم گردد.

بطور مثال؛ برای ساخت یک محیط کشت ساده ۱۵۰ میلی لیتر از محلول I را با ۱۵۰ میلی لیتر محلول II و ۱۵۰ میلی لیتر مایع شکمبه تهیه شده مخلوط نموده و ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم

باکتوکاسیتون، ۶ گرم $NaHCO_3$ و ۱ میلی لیتر رزازورین بدان اضافه می کنیم. کل محلول را با آب مقطر به حجم مورد نظر رسانده و در فلاسک می ریزیم. جهت بدست آمدن محلول شفاف آن را در ۶۰ درجه سانتی گراد و در مدت یک ساعت هم می زنیم. بایستی در طی هم زدن محلول در معرض دی اکسیدکربن قرار گیرد (این عمل را تا وقتی که رنگ صورتی محلول تغییر کند، ادامه می دهیم). سپس مواد قندی و کربنی به میزان مورد نظر و ۱ گرم سیستئین هیدروکلراید را اضافه و کل محلول ساخته شده را در دمای ۱۱۵ درجه سانتی گراد و در مدت ۲۰ دقیقه و فشار ۱۵ پوند استریل می کنیم. برای اطمینان از استریل شدن محیط کشت تولیدی می توان از آنتی بیوتیک هایی مانند کلرامفنیکل (۲/۵ میلی گرم در لیتر مایع استاندارد)، بنزیل پنی سیلین (۲۰۰۰ واحد به ازای هر میلی لیتر محیط کشت)، اکسی تتراسایکلین، نئومایسین و استرپتومایسین سولفات (۱۳۰ واحد به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) جهت جلوگیری از رشد باکتری استفاده نمود. پس از استریل به ظروف آزمایش انتقال و می توانیم بعد از سرد شدن کشت بی هوازی قارچ را انجام دهیم. برای کشت قارچی از محلول حاوی قارچ که حداکثر تا 10^{-6} رقیق شده است، استفاده می نماییم. برای شناسایی چرخه زندگی قارچ ها ۲۴ تا ۴۰ ساعت و برای شناسایی اسیدهای نوکلوتیدی در قارچ ها ۶۰ ساعت زمان برای کشت نیاز می باشد.

برای تحریک بیشتر رشد قارچ های بی هوازی شکمبه در محیط کشت با دمای ۳۹ درجه سانتی گراد و حضور گاز دی اکسیدکربن و هیدروژن می توان از اسیدهای چرب فرار مانند اسید استیک، اسید ایزوبوتیریک، اسید ۲- متیل بوتیریک، کربوهیدرات های محلول (گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز و مالتوز تا ۱ مولار)، یون آمونیوم، بیوتین، تیامین، نیکوتین آمید و نیکوتینیک اسید، سیانو کوبالآمین، ریبوفلاووین، پیرودوکسین و پیرودوکسال، اینوزیتول، سولفور و منابع احیا شدنی گوگرد مانند سیستئین و متیونین، اسیدهای چرب بلند زنجیر و سایر مواد معدنی با اسیدیته ۵/۵ تا ۷ استفاده نمود. اسیدیته بالای ۵/۵ و زیر ۷ سبب کاهش ۵۰ درصدی فعالیت های قارچی می شود. برای نگهداری طولانی کشت های قارچی ایجاد شده می توان از نیتروژن مایع یا دمای ۷۰- درجه سانتی گراد با بکارگیری ۵ درصد دی متیل سولفوکسید استفاده نمود.

۶-۲-۱-۱ کشت همزمان

در کشت های همزمان بیشتر گونه های قارچی در حضور باکتری ها واکنش عادی و حتی قوی تری از خود بروز داده اند. باکتری ها و قارچ ها به دلیل شباهت نسبی در مصرف مواد فیبری، واکنش های هم سو از خود نشان می دهند. به دلیل همین شباهت های فعالیتی آماده سازی محیط کشت قارچی و باکتریایی ساده و طبق روندهای قبلی انجام می گیرد. حتی تا حدودی می توان یک محیط کشت برای باکتری ها تنظیم و قارچ خالص سازی شده را به آنها تلقیح کرد. در طی عملیات کشت همزمان،

محققین متوجه شدند که فعالیت آنزیم آندوگلوکان در کشت همزمان قارچ - باکتری بیشتر از کشت همزمان قارچ - پروتوزوئر و باکتری - پروتوزوئر است. در یک محیط کشت مداوم (کشت های ادامه دار و پیوسته) وارد نمودن یک جنس قارچ مانند نئوکالیماستیکس به کشت باکتریایی، هضم مواد فیبری مانند کاه را تا ۱۵ درصد افزایش می دهد. کشت های همزمان نشان داده است که هضم دیواره سلولی در قارچ ها بیشتر از باکتری ها و باکتری ها بیشتر از پروتوزوئرها می باشد.

۲-۲-۶ جداسازی و شمارش قارچ ها

اگر چه ارزیابی و شمارش قارچ ها در شرایط طبیعی (در شکمبه) سخت و دشوار است، با این وجود برای شمارش دقیق تر قارچ های شکمبه می توان همانند شمارش باکتری ها اقدام نمود. در اواخر قرن بیستم محققین یک روش برای جداسازی و شمارش قارچ های بی هوازی شکمبه ارائه کردند. پس از نمونه برداری اصولی از محتویات شکمبه که تابع نوع و نحوه نمونه برداری می باشد، با کنترل اسیدیته نمونه مزبور به آزمایشگاه انتقال و پس از رقیق سازی براساس تکنیک MPN (در بخش باکتری ها تشریح شده است) کشت داده می شود. برای گرفتن نمونه مایع شکمبه می توان از طریق فیستولا اقدام و توسط گاز پزشکی آن را صاف کنیم. آنگاه، اقدام به جداسازی گونه های قارچی از طریق تشخیص کلونی های متفاوت نموده و برای شناسایی مطلوب تر آن را جداگانه کشت و بررسی می نماییم. هر چقدر میزان باکتری ها و پروتوزوئرهای نمونه گرفته شده کمتر گردد (براساس مصرف آنتی بیوتیک)، احتمال جداسازی کامل و شناسایی تنوع گونه قارچی بیشتر می شود. لذا برای شمارش قارچ های شکمبه لازم است محتویات شکمبه از لحاظ فعالیت های متابولیکی سایر میکروارگانیسم ها ثابت و محافظت گردد.

کارشناسان برای شمارش دقیق قارچ های شکمبه واحدی به نام تالوس (TFUs) را پیشنهاد نمودند که در سه بخش عمده زئوسپور، اسپورانجیوم و ریزوئیدهای هسته دار تقسیم می گردد. علت این روش در شمارش وجود بخش حرکتی قارچ در محتویات شکمبه (زئوسپور) و بخش رویشی که می تواند تولید کننده زئوسپور و بخش همضی مواد مغذی باشد. محققین بر این باورند که این روش می تواند تعداد دقیق تر قارچ ها را پیش بینی نماید. نهایتا قارچ های جدا شده از کلونی ها با افزایش رطوبت و سپس رنگ آمیزی توسط میکروسکوپ و لام های مدرج همانند سایر میکروارگانیسم ها شمرده می شوند. روش شمارش قارچ در بخش In vitro بسیار ساده تر و کم هزینه تر از بخش In vivo می باشد. اما برای آسانتر شده شمارش در بخش In vivo می توان از پرایمرهای PCR (شمارش اولیگونوکلوتیدها و هومولوگ های rDNA و rRNA در زیر واحد ۱۸ S) کمک گرفت که دقت آن

در تعیین میزان توده میکروبی بسیار بالاست. البته تکنیک پرایمری که منتج به شناسایی سیتوزین+گوانین در RNA می شود، نشان داده است تراکم این توالی قارچی کمتر از ۲۰ درصد از کل می باشد. ولی این توالی در DNA بین ۱۲ تا ۳۵ درصد متغیر است. این نشان می دهد که ترکیب DNA در قارچ ها علاوه بر هسته جایگاه های دیگری مانند میتوکندری و ریبوزوم ها دارد.

برای روش پرایمری، کل ژنوم قارچ های خالص و ناخالص کشت شده را توسط ژل گوآنیدین تیوسیانات - سیلیکا و سانتریفیوژ (۲۰۰۰ g در ۱۰ دقیقه) خالص سازی نموده و توسط پرایمرهای PCR اقدام به شناسایی و تخمین زیر واحدهای ۱۸ S می نمایند. بر پایه روش پرایمری و شمارش مستقیم، محققین تعداد قارچ های شکمبه را براساس واحد تالوس در نقاط مختلف دستگاه گوارش گاوان بررسی نمودند (جدول ۲-۶). این شمارش نشان دادکه جایگاه تخمیر و شرایط محیطی دستگاه گوارش بر حضور قارچ ها بسیار موثر بوده و قارچ ها قدرت عادت پذیری و مقاومت بالایی در برابر شرایط نامطلوب دارند.

جدول ۲- ۶ تعداد قارچ های در دستگاه گوارش گاوان (براساس واحد تالوس).

ردیف	بخش های دستگاه گوارش	تعداد
۱	شکمبه و نگاری	$۷/۶ \times ۱۰^{۸}$
۲	هزارلا	$۷/۶ \times ۱۰^{۷}$
۳	شیردان	$۳/۱ \times ۱۰^{۶}$
۴	روده کوچک	$۲/۵ \times ۱۰^{۶}$
۵	سکوم	$۳/۱ \times ۱۰^{۶}$
۶	روده بزرگ	$۶/۷ \times ۱۰^{۶}$
۷	مدفوع دام	$۴/۲ \times ۱۰^{۴}$

۳-۲-۶ شناسایی قارچ ها

یکی از بهترین راه حل های تعیین نوع قارچ استفاده از کشت کلونی خالص می باشد. در این حالت رنگ کلونی، شکل و نوع رویش می تواند معیار مناسب در شناسایی آنها گردد. مهمترین خواص ظاهری قارچ ها در این زمینه عبارتنداز:

۱- میزان رشد قارچ: حالت و شکل کلنی ممکن است مسطح، برجسته ، منظم و یا غیر منظم باشد.

۲- منظره سطح کلنی: ممکن است به صورت پودری، شبه مخمری ، دانه ای ، پنبه ای ، پشمی ، پرزی و مویی باشد.

۳- رنگ کلنی: ممکن است در مورد یک قارچ رنگ های مختلفی دیده شود . بنابراین شناخت قارچها از روی رنگ آنها بسیار مشکل است. تنوع رنگ درباره قارچ های بی هوازی شکمبه گسترده می باشد.

۴- رنگدانه: رنگ پشت کلنی که مربوط به رنگدانه ها است براساس نوع رنگدانه تولیدی توسط قارچ ها متفاوت می باشد.

برای جداسازی یک گونه قارچ از گونه دیگر جهت کشت خالص و رسیدن به کلونی مورد نظر لازم است نوع گونه قارچ شناسایی گردد. برای تشخیص گونه های قارچی می توان از شیوه مرسوم مشاهدات میکروسکوپی (جهت کنترل ساختار تشکیلاتی) و نوع اثر بر ماده خوراکی مصرف شده در کشت خالص استفاده نمود. در شیوه مشاهدات مستقیم ساختمان قارچ می تواند معیار شناسایی نوع قارچ باشد. مثلا وجود میسیلیوم یا عدم وجود آن و یا اینکه میسیلیوم دارای دیواره عرضی است یا نه ؟ همچنین می توان از طریق نوع و کیفیت هاگ به شناسایی جزئی قارچ ها پی برد. قارچ ها را می توان بدون رنگ آمیزی زیر میکروسکوپ مشاهده کرد و رنگ آمیزی فقط بخاطر شفافیت و بهتر دیدن ساختمان قارچ انجام می گیرد. در شیوه رنگ آمیزی محلول مورد استفاده لاکتوفنل-کاتن بلو می باشد که اثر نامطلوبی بر ساختمان قارچ نمی گذارد.

۳-۶ طبقه بندی قارچ های شکمبه

کارشناسان طبقه بندی قارچ ها را براساس خواص ساختمانی سلول ارائه داده اند. مهمترین معیار طبقه بندی براساس خاصیت شکل کلی قارچ (اسپورانجیوم و عملکرد آن، شکل زئوسپور و تاژک های آن و مجموعه میسیلیوم) و نحوه رشد و توسعه شکل گرفته است. معیار ضعیف تری مانند شرایط زیستی (زندگی مستقل، همزیست و انگلی) گاهی بر طبقه بندی مذکور وارد می گردد. اما معیارهایی مانند رفتار تغذیه ایی به دلیل اختلافات بسیار کم و ناچیز گونه های قارچی در محصولات تخمیری و نوع خوراک مصرفی (جدول ۳-۶) کمک اساسی در طبقه بندی نخواهد کرد. لازم به ذکر است در طبقه بندی ها بایستی به عبوری و غیر عبوری بودن قارچ ها و هاگ های آنها توجه خاصی نمود. شاید قارچ های بی هوازی و هاگ های فراوانی از راه غذا وارد شکمبه دام ها گردد، اما حضور مداوم آنها در شکمبه مدنظر می باشد. به همین دلیل کارشناسان در شناسایی قارچ ها و هاگ های واقعی شکمبه از عبوری ها معیاری مشابه باکتری ها و پروتوزوئرها در حیات شکمبه ارائه نمودند. خصوصیات مهمی چون اسیدیته، دما، پتانسیل اکسید و احیاء و نیازهای تغذیه ایی قارچ ها در محیط مخزن تخمیر از این

معیارها است. همچنین جداسازی مکرر یک قارچ از شکمبه در نقاط مختلف جغرافیایی و محل آزمایش می تواند دلیل مناسبی برای حضور دائم قارچ در شکمبه باشد.

جدول ۳-۶ چگونگی کاربرد تغذیه ای انواع پلی ساکارید توسط قارچ ها.

ردیف	نوع پلی ساکارید	نئوکالیماستیکس	پیرومایسس	سکومایسس
۱	سلولز	+	+	+
۲	اینولین	−	−	+
۳	پکتین	−	−	−
۴	پلی گالاکتورونات	−	−	−
۵	پوستولان	−	±	+
۶	نشاسته	±	±	+
۷	زایلان	+	+	+

۱-۳-۶ طبقه بندی قارچ ها براساس خصوصیات ریخت شناسی

رایج ترین شکل طبقه بندی قارچ ها براساس خاصیت ریخت شناسی (تعداد تاژک، ریسه یا ریزومیسیلیوم ها و شکل هاگ یا زئوسپور)، اختصاصات ساختمانی تولیدمثل، چگونگی تشکیل اسپور یا هاگ و زمان باروری در جدول ۴-۶ ارائه شده است. در این طبقه بندی تفکیک جنس و گونه همانند سایر طبقه بندی ها انجام گرفته و دارای تفاوت ویژه با سایر طبقه بندی های قارچی ارائه شده می باشد. طبقه بندی مذکور به دلیل شناسایی زیر گونه های (سویه) جدیدتر رو به تغییر است، اما به دلیل بررسی های اولیگونوکلوتیدی انجام شده در این روش احتمال تغییر شاخه های اولیه آن نزدیک به صفر خواهد بود.

جدول ۴-۶ طبقه بندی قارچ ها در شکمبه.

طبقات	قارچ ها	
سلسله:	ائومیکوتا	Eumycota
شاخه:	ماستیگومیکوتینا	Mastigomycotina
رده:	کیتریدیومیست ها	Chytridiomycetes
راسته:	اسپیزلومیکتالس یا نئوکالیماستیکالس	Spizellomycetales
خانواده:	نئوکالیماستیکاسه	Neocallimasticaceae
زیرخانواده:	تک قطبی (مونوسنتریک)	Monocentric
	چند قطبی (پلی سنتریک)	Polycentric

البته علاوه بر خصوصیات ظاهری در رشد و شکل، عوامل شیمیایی موجود در ساختار قارچ ها می تواند سبب افتراق بین گونه ای گردد. اما براساس عقیده کثیری از محققین بهترین معیار طبقه بندی که بتواند سرعت شناسایی را افزایش داده و هزینه ها را کمتر نماید، معیار ریخت شناسی سلولی قارچ ها می باشد. زیر خانواده براساس خصوصیت رشدی واحد تالوس به تک قطبی یا اندوژن (دارای یک مرکز رشد) و چند قطبی یا اگزوژن (دارای چندین مرکز رشد) طبقه بندی شده است. علاوه بر این گروهی از کارشناسان یک حد میانه بین تک قطبی و چند قطبی قائل گشتند که باز آن را براساس ویژگی خاصی در ردیف تک قطبی طبقه بندی نمودند. درگونه های تک قطبی کیست زئوسپور و هسته باقی می ماند و یک اسپورانجیوم واحد توسعه می یابد. همچنین، در این زیر خانواده تارهای ریزوئیدی فاقد هسته می باشد. اما در گونه های چند قطبی هسته از کیست زئوسپور خارج شده و دچار تقسیماتی می گردد. از دیگر تفاوت ها وجود تارهای ریزوئیدی هسته دار در چند قطبی ها و تشکیل ریزومیسیلیوم ها از چندین اسپورانجیا می باشد. در گونه های حد واسط هسته از کیست خارج می گردد و اسپورانجیوم در جای دیگری به صورت تک قطبی رشد می کند.

مهمترین جنس های شناخته شده در زیر خانواده تک قطبی نئوکالیماستیکس (*Neocallimastix*)، سکومایسس (*Caecomyces*) با نام قبلی اسفیروموناس و پیرومایسس (*Piromyces*) با نام سابق پیروموناس است. همچنین جنس های طبقه بندی شده در زیرخانواده چند قطبی اورپینومایسس (*Orpinomyces*) مترادف رومینومایسس، آنایرومایسس (*Aneromyces*) و سیلامایسس (*Cyllamyces*) می باشد.

۱-۱-۳-۶ جنس نئوکالیماستیکس

زئوسپور در جنس نئوکالیماستیکس کروی تا بیضی کشیده بوده و ۹ تا ۲۵ تاژک در دو ردیف مشخص آن مشاهده می گردد. البته تعداد تاژک ها در بین گونه های این جنس متغیر و از نسلی به نسل دیگر متفاوت دیده می شود. اندامک های موجود در سیتوپلاسم نئوکالیماستیکس به صورت خوشه ای و در نیمه اول پشتی سلول قرار دارد. هسته ژنتیکی در این جنس در مرکز سلول و به شکل شعاع کوچک همراه با ظاهری گرانوله جای می گیرد. پروتوپلاسم سلول نئوکالیماستیکس حاوی تارهای فیبریلی است که تمامی سلول و اندامک های آن را به صورت یک لایه نازک می پوشاند. اسپورانجیوم یا کیسه اسپور در این جنس گرد تا بیضی و با اندازه متغیر (طول ۱۳۷-۳۹ میکرومتر و عرض آن ۱۳۰-۳۹ میکرومتر) دیده می شود. مهمترین گونه های شناخته شده در این جنس فرونتالیس *N. frontalis* در گاو، پاتریشیاروم *N. patriciarum* در گوسفند، هورلینسیس *N. hurleyensis* در گاو و واریابلیس *N. variablis* نام دارد. مجموعه تارهای ریزوئیدی تشکیل شده در این جنس گاه به ۲/۵ میلی مترمربع

هم می رسد. همچنین اندازه زئوسپور در این گروه از قارچ ها بین ۸/۷ تا ۱۰/۶ میکرومتر در عرض و ۹/۶ تا ۲۰/۶ میکرومتر در طول متغیر بوده و تاژک های آن به اندامک های حرکتی داخل سیتوپلاسم متصل می باشد. فرمالدئید می تواند سبب از کار افتادن فعالیت های حرکتی تاژک گردد. همچنین، محققین در تحقیقات اخیر خود اثبات نمودند که سرعت رشد جنس نئوکالیماستیکس بیشتر از پیرومایسس، سکومایسس و حتی گونه های چند قطبی می باشد. فعالیت های سلولایتیک در این جنس بالاترازسایرجنس ها می باشد. لذا در هنگام دستکاری فلور میکروبی می توانند در تجزیه بعضی از مواد غذایی فیبری مورد توجه قرار گیرند.

تفاوت گونه های می تواند ناشی از گسترده بودن مجموعه تارهای ریزوئیدی آنها باشد. بطور مثال؛ گونه پاتریشیاروم در مقابل فرونتالیس تار ریزوئیدی گسترده تری دارد. اما در مقابل گونه فرونتالیس دارای دو اندامک حرکتی مجزا (دو قطبی در خاستگاه تاژک های حرکتی) برای تاژک های خود می باشد. معیار دیگر در جهت شناسایی گونه های این جنس الگوی تغذیه می باشد. اگر چه نمی توان مبانی رفتار تغذیه ای را در طبقه بندی قارچ ها لحاظ کرد (به دلیل تفاوت ناچیز در محصولات تخمیری)، ولی به دلیل تغییر الگوی تخمیر در بین گونه های نئوکالیماستیکس می توان برای شناسایی و طبقه بندی این گونه ها از آن بهره برد. گونه هورلینسیس بسیار متفاوت تر از سایر گونه های این جنس بوده و دارای تارهای ریزوئیدی کوچک، انقباضی و با انشعاب دو گانه در ابتدای ساقه می باشد. این گونه بالاترین تعداد تاژک (۲۰ تا ۲۵ عدد) را در بین سایر گونه های نئوکالیماستیکس دارد.

۶-۳-۱-۲ جنس پیرومایسس

اسپورانجیوم در این جنس تخم مرغی شکل، کشیده، بی قاعده (نامنظم)، دارای برآمدگی های پاپیلا و غیر پاپیلا همراه با تارهای ریزوئیدی گسترده تر و شاخه دار تر از نئوکالیماستیکس می باشد. زئوسپور در این جنس کروی تا گلابی شکل و اغلب با یک تاژک دیده می شود. سرعت انتقالی این زئوسپور در جنس پیرومایسس بالا می باشد. البته به ندرت زئوسپورهایی با ۲ تا ۴ تاژک در این جنس مشاهده شده است. گونه های مشهور پیرومایسس شامل کومونیس *P. communis* در گاو و گوسفند، مائه *P. mae* در اسب، دامبونیکوس *P. dumbonica* در فیل و سکوم اسب، ریزینفلاتوس *P. rhizinflatus* در قاطر، مینوتوس *P. minutus* در گوزن، اسپیرالیس *P. spiralis* در بز و سیترونی *P. citronii* در تک سمی ها می باشد.

۶-۳-۱-۳ جنس سکومایسس

زئوسپور در این جنس کروی تا بیضوی شکل بوده و علاوه بر خاصیت آمیبی دارای اندازه های متغیر (طول ۱۰-۷ میکرومتر و عرض ۸-۵ میکرومتر) می باشد. تاژک در زئوسپورهای سکومایسس اغلب مواقع شامل یک یا دو رشته متصل شده به عقب سلول است (درحدود ۸ تا ۱۲ میکرومتر). اما گاهی در بین گونه های این جنس ۴ تا ۷ تاژک هم مشاهده می شود. همچنین، در کنار ریشه های تاژک اندامک های هیدروژنوزوم در کنار کینتوزوم ها و ریبوزوم ها به صورت خوشه ای مشاهده می گردد، که این سه اندامک در مرکز سلول سکومایسس هم حضور دارند. ریبوزوم های موجود در سلول سکومایسس در بخش هلیک (Helice) قرار یافته است. سایر اندامک های سلولی مانند هسته موجود در سکومایسس در میان سلول (مرکز سلول) و یا به صورت جمع شده در ریشه تار ریزوئید که انشعاب کمتری داشته و حالت لوله ای دارند، قرار می گیرند. میکرولوله های ریزوئیدی موجود در جنس سکومایسس از کینتوزوم ها منشعب می شوند. همچنین، میکرولوله ها در دو جهت جلویی و عقبی زئوسپور آراسته و با حالت پروانه ای سبب حرکت آنها می گردند. در کنار اندامک های فوق پروتوپلاسم موجود در این جنس همانند جنس نئوکالیماستیکس تمامی سلول را به صورت یک لایه نازک پوشانده و تارهای ریزوئیدی کم شاخه تشکیل یافته در آن از پیازهای مختلف متصل به فیبریل ها آغاز به رشد می نمایند.

محققین شاخص ترین گونه های سکومایسس را کومونیس *C. communis* و اکوئی *C. equi* می نامند که در گوسفند و اسب مشاهده گردیده اند. این گونه ها ابتدا به اشتباه جزء گروه پروتوزوئرهای تاژک دار محسوب می شدند. مهمترین عامل افتراقی در این دو گونه زمان مورد نیاز جهت رشد ریزوئیدهای هسته دار است که در گونه کومونیس طولانی تر از اکوئی می باشد.

گروهی از محققین بر این باورند که جنس سکومایسس با اسفیروموناس سابق به دلیل تفاوت در ساختار و خاستگاه تار ریزوئیدی متفاوت بوده و باید یک جنس اسفیروموناس با گونه کومیونویس در طبقه بندی قرار گیرد. اما این فرضیه به دلیل ایرادات اساسی مورد پذیرش قرار نگرفت. نهایتا در مطالعات ریخت شناسی این گونه ها مشخص شد هسته ژنتیکی در این گونه ها به سمت جلویی سلول و در بیخ آن قرار دارد که می تواند همراه با کینتوزوم ها عامل اصلی تفاوت بین گونه ها باشد.

۴-۱-۳-۶ جنس اورپینومایسس

مهمترین ویژگی این جنس وجود ریزومیسیلیومی است که مجموعه ای بنام پلک تانشیم را که بسیار بهم فشرده و با ساختاری نرم و بزرگ دیده می شود، پایه ریزی نموده و به صورت مجموعه چند هاگدانی عمل می نماید. در این جنس اسپورانجیوم به شکل تنها از ریسه خارج و رشد می کند. اسپورانجیا در اورپینومایسس علاوه بر داشتن ساقه، بیضوی تا دوکی شکل با راس نوک تیز و با اندازه

طول ۹۵ میکرومتر و عرض ۳۵ تا ۹۵ میکرومتری مشاهده می شود. زئوسپور در این جنس دارای تاژک های چندگانه بوده و اشکال متفاوتی را با اندازه ۱۴ میکرومتر طول و ۷ میکرومتر عرض از خود بروز می دهد. هسته مرکزی در جنس اورپینومایسس سوزنی تا کره ای کوچک در مراکز سلول ها می باشد. کلونی های تشکیل یافته از اورپینومایسس ضمخت و کلفت بوده ودارای ریسه های درهم پیچیده و سخت می باشند. با وجود گونه های فراوان (تا ۱۷ گونه شناسایی شده) معروف ترین آنها را می توان بوویس *O. bovis* در گاو، جویونی *O. joyonii* در گوسفند و اینترکالاریس *O. intercalaris* در گاو و بوفالو نام برد.

فعالیت های هضم سلولز و هضم زایلان در این جنس به وفور به چشم می خورد. همچنین فعالیت های هضم فنول ها در این دسته از قارچ ها مناسب بوده و آنزیم های بتا-گلوکوزیداز، استیل استراز، کربوکسی متیل سلولاز، زایلاناز، اندوگلوکوناز، سلوبیوهیدرولاز و بتا-زایلوزیداز در این قارچ ها مشاهده می گردد.

۶-۳-۱-۵ جنس آنایرومایسس

این جنس دارای واحد تالوس با شاخه های فراوان و گسترده می باشد. داخل ریزومیسیلیوم های گسترده این جنس هسته های زیادی با اشکال متفاوت دیده می شود. زئوسپور در این جنس بیضوی تا کروی شکل، دارای اندازه متغیر با قطر ۷/۵ تا ۸/۵ میکرومتر و حاوی یک تاژک ۳۰ میکرومتری می باشد. کیسه اسپورانجیوم در آنایرومایسس ها کروی با نوک تیز و اندازه متغیر (۱۰۵ میکرومتر طول و ۴۹ تا ۹۱ میکرومتر عرض) همراه با ساقه اتصالی به ریزوئیدها است. هسته در سلول اصلی قارچ های آنایرومایسس گرد تا نامنظم و در مرکز آن قرار دارد. مهمترین گونه های آنایرومایسس، الگانس *A. elegans* در گاو و موکروناتوس *A. mucronatus* در گوسفند مهمترین آنها محسوب می شود. تحقیقات نشان می دهد فعالیت های آنزیمی مشاهده شده در این جنس مشابه پیرومایسس ها می باشد. اما نوع عمل و استراتژی هر دو جنس با هم متفاوت است.

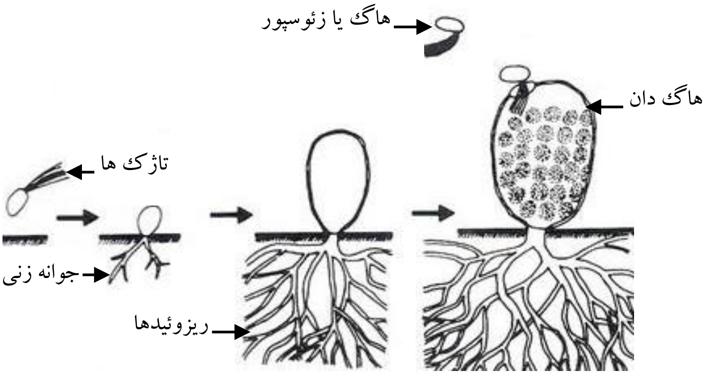
۶-۳-۱-۶ جنس سیلامایسس

زئوسپور در این جنس دارای یک یا دو تاژک با شکل کروی تا تخم مرغی مشاهده می شود. اندازه زئوسپور در این جنس بین ۱۰ تا ۱۸ میکرومتر متفاوت می باشد. اما اندازه تاژک در این جنس بزرگ تر و تا ۹۵ میکرومتر مشاهده می گردد. کیسه هاگ (اسپورانجیوم) در این جنس دارای ۲ تا ۱۲ هاگ مشخص بوده و ۱۱۵ میکرومتر طول دارد. ریشه ریزوئیدی در این جنس تک پایه و گستردگی ریزوئید در آنها کم می باشد. سیلامایسس ها تک هسته ای هستند و سایر اندامک های آن بجز هیدروژنوزوم ها

که در نزدیکی تاژک ها یا ریزوئیدها (در بخش پشتی) قرار دارد، در سلول توزیع شده است. شناخته شده ترین گونه این جنس آبرنسیس *C. aberensis* در گاو نام دارد. فعالیت های هضم سلولز در این جنس مانند سایر جنس ها کاملا مشهود است.

۴-۶ چرخه زندگی قارچ های شکمبه

قارچ های بی هوازی در شکمبه طبق مشاهدات میکروسکوپی دارای یک چرخه زیستی خاصی می باشند که می تواند عامل مهمی در ثبات و پایداری آنها در شکمبه گردد. این چرخه به دو بخش مرحله متحرک یا زئوسپور که در فاز مایع شکمبه به طور آزاد زیست می کند و مرحله غیر متحرک یا نباتی قارچ که با تولید مثل رویشی قارچ روی قطعات خوراکی هضمی انجام می گیرد. چرخه زندگی مزبور در شکل ۳-۶ مشاهده می شود. این چرخه در شکمبه تقریبا بین ۲۴ تا ۳۲ ساعت یکبار کامل می شود. این دوره در آزمایشگاه به دلیل فقدان روابط پیچیده میکروبی و خوراک در دسترس تر سریعتر رخ می دهد. در این چرخه زئوسپور در تجزیه مواد غذایی نقشی ایفا نمی کند و تنها براساس پاسخ شیمیایی به کربوهیدرات ها مواد غذایی به سمت آنها حرکت و گستره فعالیت قارچ را افزایش می دهد.



شکل ۳-٦ چرخه زندگی در قارچ های بی هوازی شکمبه.

آزادسازی زئوسپور توسط قارچ های در حال فعالیت، ۳۰ دقیقه بعد از مصرف غذا صورت می گیرد (این مدت زمان در سکومایسس و پیرومایسس ۱ ساعت است). بعد از آزادسازی زئوسپور ۲۰-۱۵ دقیقه طول می کشد تا به سمت مواد غذایی رفته و رویش خود را آغاز نماید. بعد از اتصال زئوسپور به مواد غذایی تاژک از آنها جدا شده و ساقه تندش همراه با ریزوئیدها بعد از ۲ ساعت با نفوذ به بافت های مواد غذایی آشکار می شوند. ریزوئیدها بر روی لوله تندش و در بخش انتهایی آن رشد می کنند. گسترش ریزوئیدها به تدریج ظهور مجموعه ریسه را فراهم می سازند. ریسه ها دارای بخش تخصص یافته ای به نام اسپورانجیوفورها می باشد که کیسه هاگ دان روی آنها قرار می گیرد.

کیسه هاگ (هاگ دان یا اسپورانجیوم) با بلوغ کامل (دارای اندازه ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرومتر) پاره شده و سبب آزادسازی زئوسپورها به تعداد ۲ تا ۳۸ عدد در مایع مخزن تخمیر می شود. تحقیقات نشان می دهد که ۸/۳ درصد هاگ های آزاد شده سبب پایداری قارچ در شکمبه شده و ۷۵ درصد آن خارج می شود. این بدان معنی است که افزایش هاگ دلیلی بر هضم بیشتر مواد غذایی به خصوص فیبرها نیست. البته در این میان مقداری از هاگ ها توسط پروتوزوئرها مصرف می شود. در قارچ های چند قطبی تعداد هاگ دان های تولید شده از مجموعه ریسه بیش از یک عدد بوده و این هاگ دان ها توسط ساقه هایی بر مجموعه ریسه استوار می ایستند. تعداد این کیسه ها با مصرف یک وعده غذا کاهش یافته و بالعکس تعداد هاگ ها افزایش می یابد. کاهش این کیسه ها به دلیل رقت ناشی از ورود مواد غذایی به شکمبه و تخریب آنها در هنگام آزاد شدن هاگ ها جهت گسترش بر مواد غذایی تازه رسیده می باشد. اگر چه علت آزادسازی هاگ ها همچنان ناشناخته می باشد، اما محققین آن را به عوامل موجود در خوراک مرتبط می دانند. این عوامل هر چه که باشند بعد از ۱۵ تا ۴۵ دقیقه بعد از شروع مصرف خوراک فعال و آزادسازی آغاز می شود.

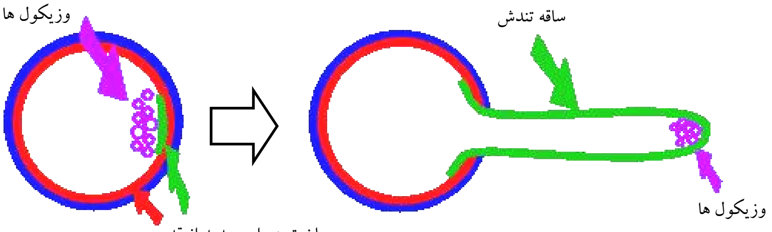
این چرخه یک روش منحصر به فرد برای هضم بافت های گیاهی و فیبر در شکمبه محسوب می گردد. کلونی قارچ ها سبب سستی بافت های گیاهی شده و هضم بیشتر مواد غذایی توسط سایر میکروارگانیسم ها را سبب می شود. تحقیقات نشان داده است که کلونی قارچ ها بیشتر روی بافت های لیگنینی مانند اسکلرانشیم و زایلم ماندگاری بالایی خواهد داشت. در طی مطالعات چرخه زندگی محققین به این نتیجه رسیدند که بعضی از قارچ ها دارای شرایط زیستی دوگانه (بی هوازی و نیمه هوازی اختیاری) می باشند. مقاومت دسته ای از قارچ ها در مدفوع دام ها و انتقال آن ها به سایر دام ها می تواند دلیلی بر این مدعا باشد. اما این خاصیت دو زیستی می تواند سبب حذف اندک اکسیژنی گردد که همراه مواد غذایی وارد مخزن تخمیر شکمبه شده است. مهمترین قارچ های دو زیست شناسایی شده در شکمبه شامل جنس های نئوکالیماستیکس، پیرومایسس و سکومایسس است.

۱-۴-۶ فعالیت های حیاتی قارچ ها

از آنجا که قارچ های شکمبه در هضم فیبر جیره موثر بوده و سبب پویایی دام ها در طبیعت می شوند، لذا حفظ و نگهداری آنها مهم و برای این کار شناخت رفتارهای آنها در شکمبه امری اجتناب ناپذیر می باشد. فعالیت های حیاتی قارچ ها همانند سایر میکروارگانیسم ها به چهار بخش رشد، تکثیر، تبادل و ایمنی تقسیم می گردد.

۱-۱-۴-۶ رشد

قارچ ها همانند سایر میکروارگانیسم ها از نمودار پنج مرحله ای رشد تبعیت می نمایند. اما، مکانیسم رشد در آنها متفاوت تر از سایر میکروارگانیسم ها می باشد. این تفاوت در رشد به چرخه زندگی قارچ ها و نحوه رشد اندام رویشی آنها باز می گردد. رشد سلولی قارچ ها از مرحله زئوسپور تا تشکیل کیسه های هاگ دان از یک گونه به گونه دیگر و حتی گاهی از والد به فرزند متفاوت دیده می شود. این تفاوت ناشی از شکل ظاهری رشد است. در حالیکه اصول رشد در همه گونه های یک جنس یکسان و فقط مدت زمان رشد، محل قرارگیری ماده غذایی و دسترسی آن و شرایط محیطی مخزن تخمیر سبب تفاوت رشد در یک گونه قارچ می گردد. یکی از اصل های موجود در رشد قارچ ها، تشکیل ساقه تندش و ریزوئید ها است (شکل ۴-۶). بعد از کسب آب کافی و حضور مواد مغذی محلول در آب، زئوسپور قارچ در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد (بالای ۴۱ درجه و زیر ۳۰ درجه رشد زئوسپور امکان پذیر نیست) شروع به تغییر نموده و یک دیواره جدید از مواد موجود در دیواره اولیه ایجاد می نماید. پس از تشکیل دیواره جدید و حذف تدریجی دیواره قدیمی رشد تندش و سپس ریزوئید ها آغاز می گردد. میزان توسعه ریزوئید در قارچ ها متفاوت و ضریب گستردگی آن به مواد غذایی قابل دسترس وابسته می باشد. و یا ایجاد و توسعه کیسه هاگ دان (از سلول های حاوی هسته در ریزوئیدها) از دیگر اصول رشد قارچ ها محسوب می شود. ولی اندازه و تعداد آنها به دلیل تغییر در تعداد زئوسپورها و گستردگی ریسه (مجموعه میسیلیوم) متغیر می باشد.

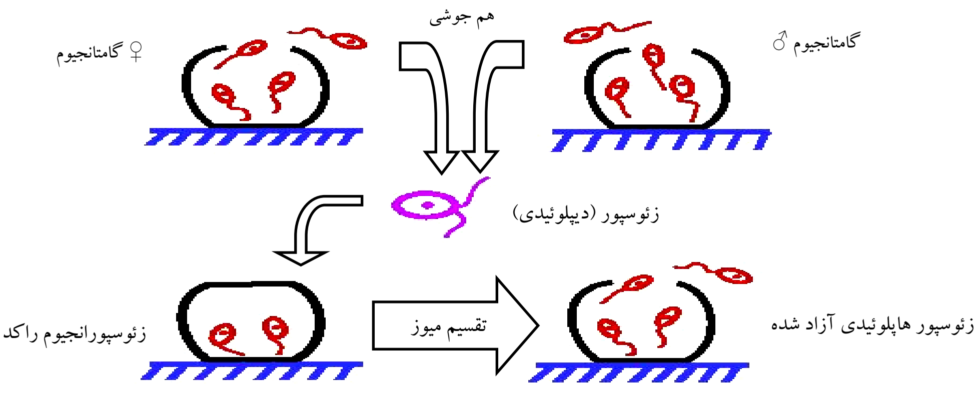


شکل ٤-٦ چگونگی رشد ساقه تندش.

۲-۱-۴-۶ تکثیر

تکثیر قارچ ها بر خلاف باکتری ها و پروتوزوئرها براساس افزایش اندازه سلول بدنی صورت نمی گیرد. از آنجا که واحد سطح به حجم در قارچ ها اهمیت چندانی ندارد، لذا فرآیند تولیدمثل آنها متفاوت تر از سایر میکروارگانیسم ها می باشد. اما اصول تکثیر قارچ ها همانند سایر میکروارگانیسم ها به دو شکل غیر جنسی (در اکثر شرایط) و جنسی (در معدود گونه ها و در زمان های خاص) انجام می گیرد. با تعیین نوع و میزان تکثیر براساس شرایط حاکم در محیط مخزن تخمیر می توان به صورت تقریبی میزان جمعیت آنها را در مخزن تخمیر براساس گذشت زمان مشخص محاسبه نمود. بدین

صورت که غلظت قارچ ها را در ساعات اولیه تغذیه و سپس بعد از مدتی مشخص اندازه گیری می نماییم. براساس تغییر غلظت در واحد زمانی می توان سرعت تکثیر را بدست آورد. آنگاه براساس سرعت تکثیر در شرایط استاندارد و حجم مخزن تخمیر، می توان به طور تخمینی غلظت پروتوزوئرها را تعیین نمود. تکثیر به روش غیر جنسی در قارچ ها غالبا همان چرخه زندگی موجود در شکل ۳-۶ می باشد که به تفصیل اشاره شده است. در این تکثیر سلول های جنسی از ریزوئیدها متمایز و اقدام به تشکیل کیسه هاگ دان همراه با هاگ های آن می نمایند. هسته سلول جنسی در کیسه هاگ دان در طی تقسیم میتوزی یا میتوتیک (Mitotic) به چند هسته تبدیل و با اندکی پروتوپلاسم که اطراف آن را احاطه می کند، و یک یا چند تاژک سلول زئوسپور را می سازند. البته در مخمرها روش های غیر جنسی دیگری به نام جوانه زدن و تقسیم دوتایی هم دیده می شود. در روش جوانه زنی، زائده ای بر روی سلول مادر ایجاد و یاخته جدید تشکیل می گردد. اما قطعه قطعه شدن ریسه ها از ناحیه دیواره عرضی به دلیل جویدن مجدد و حرکات مواد غذایی در شکمبه و تشکیل اندام کنیدی در ریسه ها (در نواحی به نام کنیدیفور) می تواند سبب توسعه و رشد گونه های قارچی شکمبه شود، که خود نوعی تولید مثل غیر جنسی محسوب خواهد شد. اما در تکثیر جنسی که شاید سالی یک بار اتفاق بیافتد، روند کاملا متفاوت می باشد. روش جنسی فقط در گونه های معدودی از قارچ های بی هوازی و در شرایط ویژه مشاهده می شوند (شکل ۵-۶). البته تکثیر جنسی (بیشتر از نوع پلانوگامی؛ در این روش وجود مایعات مانند آب الزامی است) سبب تلاقی ژن ها و بروز مقاومت بیشتر قارچ ها مقابل شرایط نامطلوب ایجاد شده در مخزن تخمیر می باشد. با تلفیق گامت های زئوسپور، نوترکیبی ژنتیکی اتفاق می افتد. بنابراین نتاج از نظر ژنتیکی از والدین خود متفاوت خواهند بود. با این وجود فرضیه تکثیر جنسی در شکمبه همچنان با ایراداتی همراه است.



شکل ۵-٦ تکثیر جنسی قارچ ها در شرایط نامطلوب محیطی شکمبه.

در این روش، ابتدا زئوسپورهای دیپلوئیدی براساس ترکیب دو گامت هاپلوئیدی حاصل از کیسه های هاگ دان تولید می شوند (در این روش زئوسپورهای غیر موافق به یکدیگر حمله و لقاح انجام می شود). در صورتی که زئوسپورهای هاپلوئیدی از یک ریسه واحد تشکیل گردند، قارچ های حاصل را هموتالیک می نامند. در حالیکه از ریسه واحدی نباشند، هتروتالیک نام می گیرند. تلفیق دو گامت هاپلوئیدی در سه مرحله اتحاد پروتوپلاسم ها (پلاسموگامی)، اتحاد هسته ها (کاریوگامی) و در نهایت اتحاد کروموزوم ها شکل می گیرد. سپس این زئوسپورها به اطراف حرکت کرده و رشد جزئی جهت تولید اسپورانجیوم می نمایند. آنگاه در این مقطع به حالت راکد یا خوابیده باقی می مانند. سپس با مساعد شدن شرایط محیطی تقسیم میوزی در زئوسپورهای دیپلوئیدی اتفاق افتاده و زئوسپور هاپلوئیدی می سازند. زئوسپور هاپلوئیدی سپس چرخه طبیعی زندگی قارچ را برای تشکیل ریسه و فعالیت های دیگر طی می کند.

۳-۱-۴-۶ تبادل

قارچ ها همانند سایر میکروارگانیسم ها نیازمند مصرف مواد مغذی و دفع سموم خود می باشند. برای رسیدن به این هدف قارچ ها همانند باکتری ها عمل می کنند. اما سیستم جذب در آنها علاوه بر روش های توضیح داده شده در فصل چهارم، به صورت تشکیل مکانیسم های مستوریوم (اندامک های مکنده)، آپرسوریوم (زائده های نفوذ)، ریزوئیدها، اندامک های شکارگر و هیفوپودیوم (پاهای ریسه ای کاذب) فعال می باشد. تبادل مواد غذایی و سموم ناشی از فعالیت های متابولیکی در قارچ های بی هوازی شکمبه بیشتر از طریق مکانیسم های مشابه در باکتری ها و در درجه دوم سیستم ریزوئیدی است که دارای محل های خاص جذب به نام Haustoria می باشند.

۴-۱-۴-۶ ایمنی

قارچ ها همانند سایر میکروارگانیسم ها با تغییرات ناگهانی در دما، رطوبت، مواد شیمیایی و اسیدیته سریعا از بین می روند. قارچ ها برای مبارزه در برابر شرایط نامطلوب و افزایش ایمنیت خود به مرحله ایی به نام هاگ زایی یا اسپور سازی (*Sporolation*) وارد می گردند. هاگ یا اسپورانجیای مقاوم (RS) سبب مقاومت قارچ در برابر عوامل نامساعد محیطی مخزن تخمیر می‌شود. پس می توان عنوان نمود که هاگ یا اسپور قارچ حالت غیر فعال یا خوابیده قارچ در برابر شرایط سخت و یا انتقال به سایر مکان ها می باشد. مراحل هاگ زایی در قارچ ها مطابق باکتری ها انجام گرفته و اندازه هاگ در قارچ ها براساس رنگ (بیشتر به رنگ قهوه ای تیره)، اندازه و شکل متنوع خواهد بود. هاگ های تولیدی به صورت تک

سلولی و گاه چند سلولی مشاهده می شوند. ساختار دیواره هاگ در قارچ ها از جنس چربی های سنگین، پروتئین های خاص و قندهای ویژه مانند تره هالوز تشکیل شده است.

۶-۵ ساختمان شیمیایی قارچ ها

درباره ساختمان شیمیایی قارچ ها و عناصر سازنده آن مقالات متفاوتی ارائه شده است. در شروع کلام می توان گفت که ترکیبات موجود در ساختمان شیمیایی قارچ ها به شدت متاثر از خوراک مصرفی و مواد مغذی در دسترس آنها می باشد. با این حال پایه ساختمان شیمیایی در قارچ ها تقریبا یکسان بوده و می تواند معیاری جهت شناسایی قارچ ها قرار گیرد. بطور مثال؛ چربی های قرار گرفته در بخش ساختمانی پیرومایسس کومونیس و جنس نئوکالیماستیکس مشابه هم می باشد. بیشترین فسفولیپیدهای مشاهده شده در ساختمان عمومی قارچ ها فسفاتیدیل اتانول آمین (بین ۳۳ تا ۴۳ درصد)، فسفاتیدیل کولین (بین ۲۱ تا ۳۱ درصد) و فسفاتیدیل اینوزیتول (بین ۸ تا ۱۸ درصد) می باشد. در این ساختار غیبت کامل اسفنگولیپیدها، گلایکولیپیدها، پلاسمالوژن یا فسفونیل مشهود و مهم است. اما در همین ساختار مقدار کمی اسیدهای چرب آزاد، تری گلیسرول ها، ۱،۲- دی آسیل گلیسرول و مقدار ناچیزتری ۱،۳- دی آسیل گلیسرول مشاهده می شود. البته موادی مانند اسکوالن و تری ترپنول (که احتمالا از تتراهیمانول می باشد) در ساختار چربی دیواره سلولی نیز رویت می گردد. فقدان استرول در این دیواره فرضیه جایگزینی اسکوالن و تتراهیمانول را به جای آن قوت بخشیده است. البته در بعضی ازآزمایشات وجود استرول در جنس نئوکالیماستیکس نشان داده شده است. قارچ ها برای سنتز استروئید که فاکتور محدود کننده رشد می باشد، به وجود ملکول اکسیژن نیازمند هستند. اکسیژن با غلظت زیاد نوعی محدود کننده محسوب می گردد. اما در غلظت کم به کمک سیتوکروم ها یا اندامک های مشابه آن در سنتز اسیدهای چرب آزاد توسط انتقال الکترون نقش اساسی ایفا می کنند. اسیدهای چرب آزاد در ساختمان چربی قارچ ها دارای ۱۲ تا ۲۶ کربن بوده و این اسیدها غیراشباع (با یک پیوند دوگانه در کربن شماره ۹ یا ۷) و اشباع شده مشاهده می شوند. کربن های مورد نیاز در سنتز اسیدهای چرب از اسید استیک و گلوکز تامین می شود.

پروتئین و مشتقات آن (مانند اسیدهای آمینه آزاد) از دیگر عناصر مهم شیمیایی قارچ ها به شمار می روند که محققین را در تعیین مقدار و ترکیب آن جهت یک طبقه بندی مناسب تر سوق داده است. میزان پروتئین براساس گونه های بی هوازی متغیر و بین ۲۲ تا ۳۲ درصد وزن ماده خشک را شامل می شود. غالب ملکول های پروتئین در ساختار قارچ ها (در حدود ۴۰ درصد پروتئین) براساس آزمایشات HPLC دارای وزن ملکولی بین ۲۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ بوده و این وزن ملکولی تا ۲۰۰۰۰۰ هم مشاهده می

گردد. اما دامنه حضور اسیدهای آمینه براساس نوع آن در گروه های مختلف قارچی یکسان تلقی می شود. البته منبع برداشت اسیدهای آمینه و یا سنتز آن از ترکیبات پروتئینی غیر واقعی مانند اوره و نیتروژن مصرفی در گونه های قارچی متفاوت خواهد بود. تجزیه و ساخت پروتئین در قارچ های بی هوازی امری بدیهی بوده و در این میان گونه نئوکالیماستیکس فرونتالیس در تجزیه و سنتز پروتئین از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. در کنار حضور پروتئین ها، کربوهیدارت ذخیره ای در پروتوپلاسم قارچ ها مشاهده می گردد. بطور مثال؛ ۴۰ تا ۴۵ درصد ماده خشک زئوسپورها را گلیکوژن ذخیره ای تشکیل می دهد.

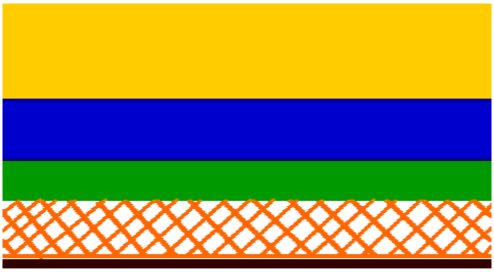
از دیگر ساختار های مهم شیمیایی قارچ ها کیتین است که از اهمیت بالایی در دیواره سلولی آنها برخوردار است. کیتین در مرحله رویشی قارچ اهمیت بسزایی داشته و طبق فرضیه مقاومت کیتین در برابر هضم در شکمبه عامل محافظتی سلول های ریزوئیدی محسوب می گردد. مقدار کیتین در گونه های مختلف قارچی متفاوت و از ۸ تا ۲۲ درصد متغیر می باشد. البته ۴۰ درصد وزن خشک شده دیواره سلولی قارچ های بی هوازی شکمبه از کیتبن تشکیل شده است. محل ساخت کیتین در ریزوئیدها صورت گرفته و در صورت وجود نیکومایسین ساخت آن متوقف می شود. توقف ساخت کیتین سبب حذف تدریجی گونه های قارچی شده و اولین جنس متوقف شده نئوکالیماستیکس خواهد بود.

۱-۵-۶ ساختمان شیمیایی دیواره سلولی قارچ ها

با وجود اینکه قارچ ها قدرت فتوسنتز کردن ندارند، اما به دلیل ساختار دیواره سلولی شباهت زیادی با گیاهان پیدا کرده اند. وجود این دیواره سبب محافظت عمومی قارچ در برابر بعضی از عوامل محیطی و آنزیم های مترشحه از سایر میکروارگانیسم ها می باشد. علاوه بر محافظت، دیواره سلولی سبب حفظ شکل واقعی پروتوپلاسم قارچ بوده و در فقدان این دیواره پروتوپلاسم قارچ به حالت فنری، پیچیده و غیر قابل تفکیک رویت می گردد. همچنین، دیواره سلولی عامل عبور انتخابی مواد مغذی و غیر مغذی به داخل و یا خارج از قارچ خواهد بود. تحقیقات نشان داده است که دیواره سلولی جایگاه نگهداری کیسه های گوارشی و محل فعالیت دسته ای از آنزیم های موجود در قارچ می باشد.

دیواره سلولی قارچ ها از دو بخش عمده (۱) زنجیره های فیبریلی؛ که از کیتین (پلی ان استیل گلوکوزآمین) و سلولز تشکیل شده است و (۲) بخش بی قاعده زمینه؛ که شامل گلوکان ها، چربی ها، پروتئین ها و مخلوطی از زنجیره های قندی (هتروپلیمرها) مانند مانوز، فوکوز، زایلوز و گالاکتوز می باشد، ساخته شده است (شکل ۶-۶). اجزای شیمیایی موجود در دیواره سلولی قارچ ها از یک گونه به گونه دیگر متفاوت است. اما این تفاوت بیشتر مربوط به بخش دوم ساختار شیمیایی و وابسته به دوره

رشدی قارچ و مواد مغذی در دسترس می باشد. در بخش های قدیمی تر دیواره ریسه ها و در بعضی از هاگ ها، حضور چربی ها برای جلوگیری از خشک شدن و رنگدانه ها برای توقف تاثیرات اشعه UV افزایش می یابد. لایه خارجی دیواره در ناحیه انتهایی ریسه تحلیل رفته و سر ریسه (Apex) را می سازد. لایه های ستاره دار شکل ۶-۶ در ریسه ها ظریف تر و در هاگ ها ضمخت تر دیده می شوند.



شکل ٦-٦ لایه های دیواره سلولی ریسه و هاگ.

درباره میزان کیتین تولیدی توسط قارچ ها اختلاف نظرهای فراوانی دیده می شود. اما آزمایشات نشان داده است که میزان آن در جنس نئوکالیماستیکس بین ۱۰۰ تا ۱۳۰ میلی گرم در هر گرم قارچ و ۲۵۰ تا ۳۰۰ میلی گرم در هر گرم جنس سکومایسس و پیرومایسس تخمین زده شده است.

۶-۶ فعالیت تخمیری قارچ ها

بررسی بر روی فعالیت های تخمیری قارچ ها بسیار ساده تر از پروتوزوئرها می باشد. علت اصلی این سادگی قابلیت نگهداری انحصاری قارچ در محیط کشت می باشد. اهمیت بررسی فعالیت های تخمیری قارچ به دلیل قابلیت هضم فیبر توسط آنها در مخازن تخمیر بی هوازی می باشد. مشارکت قارچ در هضم مواد فیبری سبب سرعت بیشتر تجزیه پلی ساکاریدها در شکمبه می شود. اما چگونگی انجام فعالیت های تخمیری و ارتباط قارچ با سایر میکروارگانیسم ها در تخمیر همواره برای کارشناسان سئوال برانگیز بوده است. بزرگترین معضل در زمینه شناسایی فرآیندهای تخمیری قارچ ها در شرایط طبیعی، تولید محصولاتی است که با تولیدات باکتری ها در هضم فیبر همسو بوده و در صورت مجزا نمودن فعالیت آنها از باکتری ها سرعت تخمیر کاهش می یابد.

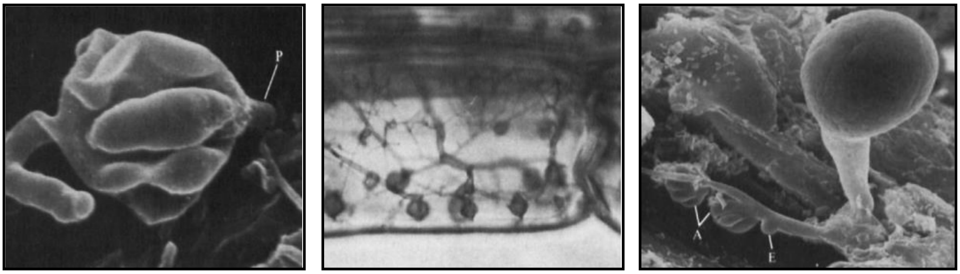
محصولات عمده تخمیر در فعالیت های قارچی هیدروژن، دی اکسیدکربن، فورمات، لاکتات، سوکسینات، استات و اتانول می باشد. البته در بعضی از گونه ها تولید سوکسینات و اتانول دیده نمی شود. میزان تولیدات تخمیری اعلام شده بسته به شرایط رشد و نوع گونه متفاوت است. شباهت تولیدات تخمیری قارچ ها با باکتری ها و شرایط تغذیه هر دو سبب شده است که ارتباط مناسب و تنگاتنگی بین هر دو ایجاد شود.

۱-۶-۶ اتصال قارچ ها به مواد مغذی

آزمایشات و مشاهدات میکروسکوپی نشان می دهد که فعالیت های قارچی بیشتر بر تجزیه و هضم بافت های فیبری گیاه یعنی پلی ساکاریدهای بزرگ انجام می گیرد. و قارچ ها قابلیت محلول کردن عناصر بزرگ موجود در ساختار گیاهی را به نحو شایسته ای دارند. بطور مثال؛ در کشت های خالص آزمایشگاهی حدود ۴۰ تا ۴۵ درصد ماده خشک عناصر فیبری موجود در کاه ظرف ۴ روز هضم و ناپدید می شوند. در این حالت ۵۰ تا ۵۵ درصد سلولز و همی سلولز تجزیه شدند و تنها ۱۶ درصد لیگنین تجزیه و ناپدید شد. مقدار کم هضم لیگنین به دلیل فقدان قدرت کامل هضم اسید فنولیک توسط قارچ ها می باشد. این قابلیت هضم و آزاد سازی عناصر سبب افزایش فعالیت های باکتریایی در سطح سلولز در دسترس می شود. برای صحت این ادعا آزمایشی توسط باکتری رومینوکوکوس آلبوس انجام شد، که این باکتری به تنهایی سبب هضم ۱۸-۱۴ درصد سلولز کاه گردید. در حالی که با ورود قارچ پیرومایسس یا نئوکالیماستیکس این میزان هضم به ۳۰ تا ۴۰ درصد افزایش یافت.

اگر چه سیستم نفوذ قارچ به بافت های گیاهی کاملا مشخص نیست، اما کارشناسان بر این باورند که قارچ ها برای نفوذ به دیواره قارچ ها از نیروی مکانیکی یا شیمیایی و بیشتر ترکیبی از هر دو نیز استفاده می کنند. فعالیت های هضم سلولز و پروتئین می تواند سبب نفوذ ریزوئید ها به داخل لایه های سلولز و بافت های پروتئینی گیاهی شود. لایه های پروتئینی گیاهی می تواند سبب منع ورود باکتری هضم کننده سلولز به بافت گیاهی گردد. با از بین رفتن بخش پروتئینی گیاه توسط قارچ قدرت نفوذ باکتری و به تبع قدرت نفوذ قارچ افزایش می یابد (در شرایط طبیعی حضور باکتری ها و قارچ ها در کنار هم نفوذ هر دو را به بافت های گیاهی بیشتر خواهد نمود). در شرایط طبیعی نفوذ قارچ ها به عناصر غذایی به صورت ترکیبی با باکتری بیشتر مد نظر می باشد. حتی در مشاهدات میکروسکوپی ادعای مزبور به صورت اتصال باکتری به زئوسپورها و جابجایی هر دو با هم در محیط شکمبه اثبات شده است. تحقیقات نشان می دهد برای هضم و نفوذ به لایه های مقاوم گیاهی قارچ ها به صورت دسته های بزرگ وارد عمل می شوند. این دسته های بزرگ می توانند در طی ۲ تا ۳ ساعت تشکیل و عملیات مورد نیاز انجام گیرد. کلونی قارچی بیشتر در محل های آسیب دیده (ناشی از خرد شدن توسط جویدن) و یا دهانه های ورود Stomat به بافت گیاهی مشاهده می شوند. لیگنین تنها مانع اصلی اتصال یک کلونی به بافت گیاهی می باشد. اما بعد از اتصال قارچ در اثر فشارهای مکانیکی مبادرت به نفوذ بیشتر به بافت هدف می کند. سست بودن بافت گیاهی فعالیت باکتریایی را بیشتر از قارچ ها نموده و بالطبع تعداد قارچ ها کمتر خواهد شد. لذا خرد شدن بیش از اندازه ذرات غذایی سبب کاهش فعالیت های قارچی می شود.

قارچ برای نفوذ ابتدا اندام ریزوئیدی خود را در محل آسیب دیده بافت گیاهی توسعه داده و برای نفوذ ساختار کروی دکمه مانند که کیسه گوارشی است، تشکیل می دهد. پس از تشکیل کیسه های گوارشی دکمه ای اولین نفوذ در دیواره بافت گیاهی مزوفیل و سلول های پارانشیمی پس از یک ساعت آغاز می شود. بعد از ۶ ساعت کیسه های گوارشی به اسکلرانشیم نفوذ و آنزیم های هضمی خود را از طریق میخک ها در آن تزریق می کنند (شکل ۷-۶). کیسه های گوارشی مجموعه ای از حباب های دور هم هستند که در کنار هم و در حول یک محور واکوئل دکمه ای را تشکیل می دهند. تعداد این کیسه های بین ۵ تا ۱۰ عدد متغیر و دارای اندازه های متفاوتی با طول ۱۶/۸ - ۱/۴ میکرومتر و عرض ۱۲/۶ - ۱/۰ میکرومتر قابل مشاهده می باشند.



شکل ۷-٦ اتصال قارچ به بافت گیاهی؛ شکل سمت راست واکوئل گوارشی (A)، شکل میانی نفوذ واکوئل گوارشی به بافت پارانشیمی و شکل سمت چپ میخک (P) واکوئل را نشان می دهد.

از مشخصات دیگر واکوئل های گوارش فاقد ساقه، چسبنده، کیسه های متقارن و برجسته که بسیار شبیه به یک گل نو رس هستند. این مجموعه توسط یک میخک به طول ۰/۵ تا ۰/۸ میکرومتر تمامی آنزیم های مورد نظر خود را روی بافت گیاهی ریخته و آنرا هضم می نمایند. شکل و اندازه واکوئل های گوارشی در قارچ ها متغیر و هر پایه ریزوئیدی می تواند تعداد زیادی از آنها را ایجاد نماید. اما پس از حذف مواد غذایی واکوئل ها به شدت کاهش می یابند. در طی نفوذ واکوئل های گوارشی و ایجاد واکوئل جدید در مکان تازه تر باکتری ها هم وارد محوطه شده و سرعت نفوذ را بیشتر می کنند. با وجود آزمایشات مناسب و مکرر در زمینه اتصال قارچ با مواد غذایی اطلاعات درباره نحوه اتصال قارچ ها به بعضی از مواد غذایی همچنان با اندک شبهاتی همراه است. اما محققین متوجه شده اند که قارچ و زئوسپور آنها به صورت متناوب و آزادانه براساس فعالیت های شیمیایی خوراک ها به مواد مغذی متصل می گردند.

۲-۶-۶ متابولیسم قارچ ها

از آنجا که قارچ ها در شکمبه نشخوارکنندگان اقدام به هضم مهمترین ماده غذایی یعنی فیبر جیره می نمایند، شناسایی دقیق نوع فعالیت های متابولیکی آنها جهت کنترل تولیدات تخمیر و دستکاری بهینه میکروفلور شکمبه اهمیت بسزایی دارد. این اهمیت زمانی جلوه بیشتری پیدا می کند که جمعیت قارچ ها در شرایط مطلوب به ۲۵ درصد ماده خشک میکروبی برسد. برای شناسایی بهتر روندهای متابولیسمی می توان از محیط کشت های منفرد و سپس توام با سایر میکروب ها بهره جست. اما در هر صورتی لازم است محیط کشت متناوب و ادامه دار باشد تا روند متابولیسمی به صورت دینامیک بررسی گردد.

از تفاوت های اصلی متابولیسم قارچ ها با باکتری ها وجود فعالیت های همه جانبه توسط یک گونه خاص قارچی می باشد. این در حالی است که باکتری ها از چنین قدرتی تا حد گسترده ای محروم هستند. بطور مثال؛ فعالیت های هضم پروتئینی (پروتئازی) با خصوصیات هضم سلولزی در قارچ ها در یک گونه هم مشاهده می شود. اما باکتری ها یا تجزیه کننده پروتئین هستند و یا تجزیه کننده سلولز می باشند. این خصوصیت می تواند شناسایی مسیر متابولیسمی را به دلیل عدم نیاز به گونه های دیگر قارچی و یا مواد مغذی اضافی آسانتر نماید.

۱-۲-۶-۶ تخمیر کربوهیدرات ها

تا به امروز همه قارچ های جدا شده از شکمبه نشخوارکنندگان قابلیت تجزیه کربوهیدرات ساختمانی و غیر ساختمانی را از خود نشان داده اند. اما مشاهده می شود که قارچ ها برای شناسایی مواد خوراکی اضافه شده در محیط های مختلف تخمیری مانند شکمبه از کربوهیدرات محلول (به طور جزئی) آزاد شده از خوراک استفاده می نمایند. ولی برای فعالیت های اساسی خود بیشتر تمایل به هضم کربوهیدرات های ساختمانی به خصوص بافت های ضخیم آوندی و اسکلرانشیمی دارند. این تمایل به دلیل قدرت نفوذ ریسه های قارچ به بافت های غیر قابل دسترس فیبر می باشد. این روش از تغذیه سبب تضعیف بافت های مستحکم گیاه شده و نوعی دسترسی فیزیکی برای سایر میکروارگانیسم ها فراهم می نماید.

واضح است که قارچ ها به دلیل وجود دامنه گسترده ای از آنزیم ها، قدرت هضم اکثر مواد کربوهیدراتی را دارند. کربوهیدرات ها اصلی ترین منبع انرژی برای قارچ ها محسوب می شوند. اکثر مونوساکاریدهای گیاهی مانند فروکتوز، گلوکز، زایلوز، سلوبیوز و جنتوبیوز مصرف عمومی قارچی داشته و بعضی از قندها مانند گالاکتوز، لاکتوز و مانوز کاربرد کمتر و ال – آرابینوز اصلا کاربردی در تغذیه ندارد. قندهای دی ساکاریدی گالاکتوز، رامنوز، مالتوز و ریبوز با وجود اینکه جزء مواد اصلی ساختاری گیاهی محسوب می شوند، توسط بعضی از قارچ های بی هوازی شکمبه که بیشتر از جنس های سکومایسس، آنایرومایسس و پیرومایسس می باشد، مصرف نمی شوند. در این بین کاربرد غذایی

اولیگوساکاریدها (مانند رافینوز) و پلی ساکاریدها هم دارای تنوع گسترده ای بوده (مانند اینولین، پولان، نشاسته) و پلی ساکاریدهای سلولز، همی سلولز و زایلان توسط همه گونه های قارچی مصرف می گردد. اما تا وقتی قندهای محلول مصرف نشوند، قارچ ها به سراغ پلی ساکاریدها نمی روند. اما به دلیل وجود واحدهای قندی بی شمار در زنجیره های پلی ساکاریدی (مانند سلولز، همی سلولز، زایلان، پکتین و انبارهای پلیمری نشاسته، گلیکوژن و اینولین)، تجزیه و تخمیر آنها از اهمیت خاصی برخوردار است. اگر چه اکثر گونه های قارچی بخش غیربلوری (غیرکریستاله) سلولز را هضم می نمایند (در رقابت با باکتری ها)، اما بعضی از گونه ها در جنس های سکومایسس، آنایرومایسس و پیرومایسس به سختی بخش بلوری سلولز را هضم می کنند. تخمیر پکتین اگر چه توسط هر دو گونه های قارچی تک قطبی و چند قطبی دیده می شود، اما اعتماد کاملی در این زمینه حاصل نشده است. زیرا در طی تحقیقات تعداد کثیری از قارچ ها بجز نئوکالیماستیکس فرونتالیس (جنس نئوکالیماستیکس و بعضی از تک گونه های قارچی دارای آنزیم های پکتین لیاز داخلی و پلی گالاکتورناز جهت هضم پکتین می باشند)، بر روی کربوکسی متیل سلولاز و پکتین یا اسید پلی گالاکتورونیک رشد ننموده اند. زایلان از دیگر زنجیره های کربوهیدراتی محسوب می شود که اغلب قارچ ها قادر به هضم کامل آن می باشند.

سرعت مصرف کربوهیدرات ها از دسته معیارهایی است که می تواند ما را در شناسایی بهتر تخمیر کربوهیدرات ساختمانی و غیر ساختمانی توسط قارچ ها یاری رساند. گزارشات ارائه شده نشان می دهد قارچ ها گلوکز را در مقابل فروکتوز و زایلوز بهتر مصرف می کنند. حتی در طی روند آزمایش تخمیر فروکتوز (که با مالتوز از لحاظ سرعت جذب در یک ردیف قرار دارند) یا زایلوز، ورود گلوکز سبب شد که قارچ ها را به سمت گلوکز گرایش یابند. و نسبت به فروکتوز و گلوکز بهره گیری از سلوبیوز و سوکروز برای قارچ ها آسانتر و سریع تر است. لذا تحقیقات نشان داده است که ساخت یک آنزیم برای هضم و تجزیه یک قند به وسیله حضور مواد مغذی دیگر کنترل می شود. بدین صورت که آزمایشی نشان داد تجزیه و تخمیر سلولز در گونه های پیرومایسس بوسیله مواد مغذی گلوکز، سلوبیوز و نشاسته متوقف شد.

محصولات نهایی تخمیر کربوهیدرات ها بواسطه فعالیت قارچ های بی هوازی شکمبه هیدروژن، دی اکسیدکربن، فورمات، دی -لاکتات، سوکسینات، استات، اتانول و در شرایط خاص مالات و پروپیونات می باشد (در این روند بعضی از گونه ها سوکسینات و اتانول تولید نمی کنند). همچنین در طی تخمیر قندها به مقدار مکفی گلیسرول تولید می گردد، اما به دلیل ابقای سریع آن در سلول قارچی و فقدان آن در محیط بیرونی کمتر این محصول به چشم می آید. گلیسرول در انتقال الکترون و معادلات اکسید و احیاء کمک ویژه ای به قارچ ها می رساند. میزان محصولات نهایی تخمیر براساس گونه

قارچی و شرایط رشد متفاوت خواهد بود. از آنجا که بر خلاف باکتری های بی هوازی شکمبه مسیر فرآیندهای تخمیری در بین گونه های قارچی مشابه و تفاوت فاحشی ندارد، محصولات تخمیر در قارچ ها کاملا مشابه می باشد. هیدروژن از دسته محصولاتی است که در همه گونه های قارچی تولید می گردد. حضور اکسیژن در مخزن تخمیر تولید هیدروژن را که عامل کنترل متابولیسم در قارچ ها است، ۵۰ درصد کاهش می دهد. در صورت فعالیت قارچ با سایر میکروارگانیسم ها بخصوص دسته مصرف کننده هیدروژن، الگوی تخمیر کربوهیدرات به سمت تولید اسید استیک بیشتر و اسید لاکتیک و اتانول کمتر گرایش می یابد. در بین قارچ ها، گونه های چند قطبی در مقابل تک قطبی ها کمترین میزان تولید اسید لاکتیک را خواهند داشت. البته در تحقیقات جدید مشاهده گردید که گونه های پیرومایسس از دسته تک قطبی ها در بعضی از کشت ها اقدام به تولید اسید لاکتیک نکرده اند.

قارچ های بی هوازی شکمبه از طریق مسیر امبدن- میرهوف (یا چرخه گلیکولیز) واحد قندی گلوکز را به پیروات یا فسفوانول پیروات تبدیل می کند. در طی مسیرهای متابولیسمی، کربن درون سیتوپلاسم و یا اندامک های خاص مانند هیدروژنوزوم ها به لاکتات، اتانول، فورمات و سوکسینات تغییر یافته و و در انتها به استات و دی اکسیدکربن ختم می شود. در طی تخمیر قارچ ها نیتروژن مورد نیاز خود را از آمونیاک و سولفور خود را از سولفیدها تهیه می نمایند. در مسیر متابولیسم قندها حضور بیوتین، تیامین و همین (Haemin) الزامی است.

قارچ ها علاوه بر کربوهیدرات های ساختمانی فوق قدرت تجزیه بافت های مستحکم شبه قند مانند لیگنین را هم دارا می باشند. تحقیقات نشان می دهد قارچ ها گرایش وافری جهت تشکیل کلونی بر روی لبه های آسیب دیده بافت های مستحکم گیاه مانند لیگنین دارند. حضور قارچ ها سبب تجزیه بیشتر و بالاتر این بافت گیاهی در مقایسه با سایر میکروارگانیسم ها خواهد شد. قارچ ها با تخریب ساختار غیر قابل تجزیه لیگنین، مواد غذایی مورد نیاز خود و باکتری ها را در محیط مخزن تخمیر فراهم می نمایند. در این راستا قارچ ها همانند سایر میکروارگانیسم ها قدرت تخریب اسیدهای فنولیک، کوماریل و سیناپیل لیگنین نبوده و حتی برای بافت های قارچی سم حساب خواهند شد. اما تفاوت قارچ ها با دیگر میکروب ها وجود قدرت تخریب و هضم باندهای استری متصل کننده لیگنین به همی سلولز و سلولز توسط آریل استرازها می باشد. این عمل با تولید فرولویل استراز در اکثر قارچ ها و پی کومارویل استراز در نئوکالیماستیکس ها و اورپینومایسس ها انجام می گیرد. این دو آنزیم به صورت هم کوشی با دیگر آنزیم ها مانند زایلاناز فعالیت گسترده ای از خود نشان می دهند.

۲-۲-۶-۶ تخمیر پروتئین ها

بسیاری از گونه قارچی علاوه بر تخمیر کربوهیدرات ها قادر به هضم و تخمیر پروتئین ها می باشند. این ویژگی سبب شده است که قارچ ها در زمینه تخمیر و متابولیسم مواد مغذی یک طبقه بالاتر از باکتری ها قرار گیرند. زیرا باکتری هایی که به تخمیر کربوهیدرات ها مانند سلولز مبادرت می ورزند، فاقد قدرت واقعی در تخمیر پروتئین ها می باشند. قارچ ها آنزیم های هضم کننده پروتئین خارج سلولی خود را از درون ریسه ها به مواد مغذی ترشح و مواد حاصل را طی انتقال فعال و انتشار جذب می نمایند. فعالیت های پروتئازی قارچ ها مانند آنزیم پپتیداز در اسیدیته ۷/۹ بیشترین کارآیی را دارد. اما در اسیدیته ۵ فعالیت پروتئازی قارچ همچنان مشاهده می شود. دامنه فعالیت پروتئازهای قارچی بین اسیدیته ۶/۵ تا ۹ فعال می شود. در تحقیقات ارائه شده مشخص گردید که نوع فعالیت های پروتئازی علاوه بر شرایط محیطی تخمیر، به کمیت و کیفیت خوراک مصرفی و گونه های قارچی وابسته و به شدت متغیر خواهد بود. مهمترین مثال در این زمینه هضم کازئین توسط گونه های چند قطبی مانند اورپینومایسس جویونی است که در گونه های تک قطبی مانند نئوکالیماستیکس فرونتالیس مشاهده نمی گردد. با این وجود قارچ ها در هنگام تجزیه پروتئین مشارکت همه جانبه با باکتری ها ارائه می دهند و این مشارکت در پروتئین گیاهی و یا پروتئین هایی با بافت مستحکم در بالاترین سطح قرار دارد.

قارچ ها علاوه بر تجزیه پروتئین قابلیت ساخت آنها را از ترکیبات نیتروژنی دارا می باشند. اما کمیت و کیفیت این ساخت همچنان با شبهاتی همراه است. علت این شبه وابسته بودن قارچ ها به اسیدهای آمینه خاصی است که باکتری ها قادر به ساخت آنها می باشند. لذا در کشت های توام قارچ با باکتری ساخت کامل پروتیئن توسط قارچ ها امکان پذیر بوده و در صورت فقدان کشت توام ساخت پروتئین منوط به حضور اسید آمینه های خاص در محیط کشت یا مخزن تخمیر می باشد. با این وجود در آزمایشی محققین سه گونه قارچ اورپینومایسس جویونی، نئوکالیماستیکس پاتریشیاروم و پیرومایسس کومونیس را در کنار مواد نشاسته ای قرار دادند و آمونیاک به آن افزودند. در طی آزمایش غلظت آمونیاک کاهش یافت، که بیانگر استفاده این سه قارچ از نیتروژن جهت ساخت پروتئین می باشد.

۳-۲-۶-۶ تخمیر چربی ها

مصرف چربی به صورت اسیدهای چرب آزاد می تواند اثر سوئی بر هضم فیبر و تخمیر آن در شکمبه ایجاد نماید. در بین میکروارگانیسم ها قارچ ها بیشترین ضرر را در صورت وجود اسیدهای چرب آزاد در شکمبه خواهند داشت. اگر چه مکانیسم کاهش همچنان دارای ابهام می باشد، اما آزمایشات نشان می دهد که اضافه کردن روغن به جیره سبب کاهش فعالیت های هضمی قارچ ها خواهد شد. فرضیه اصلی با کاهش فعالیت های هضمی در اثر ورود چربی، جمعیت قارچ ها در شکمبه کاهش می یابد. آزمایشات نشان می دهد که در صورت مصرف نمک های کلسیمی همراه با روغن

های مصرفی می توان جمعیت زئوسپورهای قارچی را احیاء نمود. اما این روش هیچ تاثیری بر فعالیت قارچ ها در شکمبه نخواهد گذاشت. عده ای از محققین بر این باورند که اسیدهای چرب فرار غیراشباع اثرات سمی کمتری بر فعالیت های قارچی و سایر میکروارگانیسم ها خواهد گذاشت.

۶-۶-۳ متابولیسم میانی در قارچ ها

متابولیسم میانی قارچ های شکمبه بجز آنزیم های خاص مترشحه از آنها با سایر میکروارگانیسم ها همسان و مشابه انجام می گیرد. برای تجزیه و تخمیر کربوهیدرات، قارچ ها از مسیر امبدن- میرهوف استفاده می کنند. برای مشخص کردن مسیرهای میانی متابولیسم لازم است از کربن های برچسب دار (Marker) استفاده گردد. قارچ ها از طریق گلیکولیز اقدام به تولید فسفوانول پیروات نموده و از این طریق مسیر اگزالواستات را فعال و آن را تبدیل به مالات می نمایند. قارچ ها می توانند از طریق اکسیداسیون مسیر پیروات به مالات و بالعکس، از طریق جفت شدن NADPH: فرودوکسین ردوکتاز و آنزیم هیدروژناز، هیدروژن و انرژی مورد نیاز خود را تولید کنند (میزان هیدروژن تولیدی در قارچ ها متغیر و بین ۲±۸/۱ نانومول در دقیقه می باشد). البته بعضی از ملکول های پیروات تولید شده به سمت استیل کوآنزیم آ از طریق پیروات:فرودوکسین اکسیدردوکتاز گرایش و از آن به استات تبدیل می شوند. اما انباشته شدن بیش از حد هیدروژن و دی اکسید کربن در محیط مخزن تخمیر می تواند سبب توقف آنزیم های هیدروژناز، پیروات:فرودوکسین اکسیدردوکتاز و فعالیت پیروات دکربوکسیلاز گردد. با حذف این فعالیت ها، ساخت استات و بالطبع رشد قارچ محدود و حذف می گردد. لاکتات تولیدی در مسیرهای میانی توسط آنزیم لاکتات دهیدروژناز سیتوزولی و اتانول از تغییر استالدئید به واسطه آنزیم الکل دهیدروژناز تولید می گردند. افزایش بی رویه نیتروژن گازی و کاهش شدید دی اکسیدکربن سبب توقف ساخت اتانول در سیتوزول قارچ ها می شود. هیدروژنوزوم های سلولی و کینتوزوم های قارچی به طول ۰/۵ تا ۱ میکرومتر جهت پیشبرد متابولیسم های میانی از موارد حیاتی محسوب می شوند. فعالیت های ATP آز و احتمالا ADP/ATP ترانس لوکاز از مهمترین فعالیت های انرژی زا محسوب می شوند که در بخش هیدروژنوزوم های سلولی به وفور یافت می گردند. علاوه بر آنزیم های فوق، فسفوانول پیروات دی کربوکسیلاز، مالات دهیدروژناز و پیروات کیناز کنترل کننده اصلی مسیرهای میانی متابولیسم در قارچ ها می باشند.

۶-۶-۳-۱ آنزیم در قارچ های بی هوازی

دامنه تولید آنزیم های خارج سلولی در قارچ ها به دلیل تنوع ماده غذایی مصرفی اعم از کربوهیدرات، پروتئین و چربی گسترده می باشد. محل ساخت و انباشته شدن آنزیم ها در ریسه و بیشتر

در راس آن قرار گرفته است. ترشح و تولید آنزیم در قارچ ها به دلیل وجود چرخه زندگی دارای نوسان کمیتی بالایی می باشد. این نوسان در سه سطح غلظتی مورد اتفاق کارشناسان است. تولیدات آنزیمی در قارچ ها بیشتر مربوط به گروه های تجزیه فیبر (فیبرولایتیک) بخصوص زیر گروه سلولز و زایلان می باشد. کارشناسان مهمترین آنزیم های شناخته شده را در قارچ های بی هوازی به ترتیب سلولاز، زایلاناز، همی سلولاز، پکتینازها (مانند اندوپکتین لیاز)، پروتئازها، دکسترینازها، آمیلاز، آمیلوگلیکوزیدازها (مانند فروکتوزیدازها، آلفا-ال-آرابینوفورانوزیدازها)، اندو و اگزو گلوکانازهای دیگر، استرازهای هضم کننده لیگنین، انواعی از دی ساکاریدازها، اگزونوکلئازها و در بعضی از گونه های قارچی اندو و اگزوکیتینازها نام می برند. فعالیت آنزیم های نام برده بین اسیدیته ۴/۵ تا ۷/۵ (اسیدیته مطلوب آنها ۶ می باشد) و در درجه حرارت ۳۰ تا ۵۰ درجه (درجه حرارت مطلوب آنها ۲±۳۹ درجه سانتی گراد است) اتفاق می افتد.

تعیین مقدار آنزیم مترشحه از قارچ ها به محیط کشت آنها وابسته می باشد. بطور مثال؛ در محیط کشت ساده و خالص میزان آنزیم ۳ برابر و در محیط کشت ادامه دار تا ۱۲ برابر حالت طبیعی ترشح آنزیم مشاهده می شود. این مسئله می تواند به دلیل فقدان روابط پیچیده قارچی در محیط های طبیعی باشد. همچنین، فعالیت و مقدار آنزیم موجود در محیط خارجی مخزن تخمیر به شدت توسط مواد غذایی موجود کنترل می گردد. مثلا حضور گلوکز جلوی فعالیت آنزیم سلولاز و وجود زایلوز و آرابینوز جلوی فعالیت آنزیم زایلاناز را خواهد گرفت. از طرفی وجود مکمل گوگرد سبب افزایش فعالیت های سلولازی قارچ ها می شود.

۶-۷ جمعیت قارچ ها

اگر چه مطالعه جمعیت قارچ ها در شرایط طبیعی شکمبه کاری بسیار مشکل است، اما به دلیل اهمیت فعالیت آنها در تخمیر کنترل آن سودمند می باشد. قارچ ها از سن ۱۰ روزگی بعد از تولد در هضم مواد غذایی گیاهی بخصوص آن دسته از گیاهانی که دارای بافت مستحکمی هستند، نقش اساسی داشته و می توانند ۶۰ درصد ماده خشک گیاهی را تجزیه و تخمیر کنند. و از طرفی به دلیل قابلیت هضم مشارکتی مناسب قارچ ها با باکتری ها در هضم مواد فیبری و جمعیت بالای آنها در شکمبه (بین ۸ تا ۲۵ درصد کل ماده خشک میکروبی) کنترل جمعیت آنها اهمیت زیادی پیدا نمود. امروزه تحقیقات نشان داده است که حذف قارچ ها از شکمبه سبب کاهش فعالیت های هضمی خوراک گیاهی و از طرفی عامل کاهش ۱۲ تا ۱۸ درصدی ماده خشک مصرفی می گردد. همچنین، حضور قارچ ها در کنار باکتری های بی هوازی می تواند افزایش ۳۰ درصدی هضم مواد غذایی فیبری در مخزن تخمیر مانند

شکمبه را شامل شود. عوامل موثر بر جمعیت قارچ های شکمبه تابع سه اصل اساسی شرایط محیطی مخزن تخمیر، خوراک مصرفی و اثرات بیرونی دام بر جمعیت های قارچی می باشد.

۶-۷-۱ اثر خصوصیات مخزن تخمیر بر جمعیت قارچ های شکمبه

خصوصیات محیطی مخزن تخمیر از عوامل بسیار مهمی در تغییر نسبت مراحل رویشی و حرکتی قارچ ها بوده و این تغییر سبب دگرگونی غلظتی جمعیتی قارچ ها می شود. کوچکترین تغییر در هر یک از خصوصیات اصلی مخزن تخمیر مانند اسیدیته، اکسیداسیون- احیاء، تغییر اسمولاریته، تجدید محتویات شکمبه، سرعت و توزیع تخمیر می تواند سبب حذف (هر چند به مدت زمان کوتاهی انجام شود) یا گسترش یک یا چند گونه قارچی گردد. البته شدت تغییر گونه های قارچی همانند سایر میکروارگانیسم ها نبوده و اکثر گونه های قارچی به صورت هماهنگ با هم فعالیت می نمایند. افزایش اسیدیته شکمبه (افت pH به زیر ۴/۵) سبب کاهش ناگهانی و در طولانی مدت باعث حذف کامل قارچ ها از شکمبه می شود. اما با به تعادل رسیدن اسیدیته شکمبه بعد از مصرف خوراک فیبری حضور قارچ ها از لحظات اولیه بعد از شوک اسیدی آغاز و به حداکثر می رسد. علت سرعت زیاد آنها در حضور مجدد مربوط به ساختار ایمنی قارچ ها (مرحله زئوسپور و هاگ سازی) و حضور وافر هاگ های آنها در خوراک گیاهی و محیط پیرامونی دام می باشد. آزمایشات روزانه نشان داده است بین اسیدیته و جمعیت قارچی شکمبه یک رابط معنی دار و معکوسی وجود دارد. شرایط رشد مجدد قارچ ها در شکمبه (ژرمیناسیون) در اسیدیته ۵/۵ آغاز و در اسیدیته ۶/۴ به حداکثر خود می رسد. تغییرات اکسیداسیون- احیاء و پتانسیل ردوکس محیط شکمبه هم بر اثر تجمع یون هیدروژن از مواردی است که می تواند با اسیدیته ارتباط مستقیم داشته و بر کاهش فعالیت های قارچی از طریق توقف تبادلات آنها موثر واقع شود. همواره تجمع یون هیدروژن بعد از مصرف خوراک به مدت ۳ تا ۶ ساعت دیده شده است که سبب کاهش غلظت قارچ ها به دلیل محدود کننده بودن آن در شکمبه می گردد.

تغییر اسمولاریته از معیارهای مهم دیگری است که بر غلظت همه قارچ ها موثر می باشد. تغییر اسمولاریته مایع شکمبه وقتی منجر به وضعیت هیپوتونیک گردد (بلافاصله بعد از نوشیدن زیاد آب و مصرف خوراک مایع قندی)، مرگ قارچ ها را افزایش داده و تکثیر را متوقف می کند. علاوه بر اسمولاریته، دمای مخزن تخمیر هم بر جمعیت قارچ ها وهم بر نسبت وضعیت رویشی به حرکتی آنها موثر می باشند. اگر چه در آزمایشات مشاهده شده است که گونه های نئوکالیماستیکس گاهی در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد اقدام به رشد نموده اند، اما دامنه حرارتی مطلوب بین ۳۲ تا ۴۱ درجه می باشد. بیشترین فعالیت قارچی در ۳۹ درجه سانتی گراد انجام می گیرد.

۲-۷-۶ اثرات بیرونی مخزن تخمیر بر جمعیت قارچ های شکمبه

تنوع قارچ ها و جمعیت آنها در مخازن تخمیر همانند سایر میکروارگانیسم ها می تواند ناشی از تنوع اقلیمی (نوع گیاهان موجود در محل سکونت دام) و گونه های دامی یا جانوری (اختصاصی شدن میزبان) باشد. اگر چه گونه های اصلی قارچ در تمامی دام ها و سایر نشخوارکنندگان به دلیل قدرت پراکنش بالای آنها (بواسط تشکیل هاگ های مقاوم) تقریبا یکسان مشاهده می شود، اما کارشناسان اندک گونه های قارچی را یافته اند که در گونه های جانوری متفاوت و با جمعیت کم آشکار می شوند. لذا براساس پیش فرض ارائه شده تفاوت جمعیت های قارچی و نوع گونه های آن مربوط به تکامل ساختارهای دستگاه گوارش میزبانان و تنوع خوراک مصرفی آنها می باشد. حال در صورت ورود یک گونه جدید قارچی از یک جانور به جانور دیگر و یا از یک منطقه به منطقه دیگر (براساس حمل خوراک) بدون عادت پذیری می تواند علاوه بر تاثیرات منفی جمعیت سایر قارچ ها را نیز دستخوش تغییر کند. در این زمینه اگر چه اطلاعات کمی وجود دارد، ولی اندک تحقیقات انجام شده تنوع گونه های قارچی در دام های مختلف را اثبات می نماید. بطور مثال؛ وجود پیرومایسس سیترونی که در تک سمی ها قابل پیگیری است، در نشخوارکنندگان بخصوص گاوها مشاهده نمی شود. حال با ورود این گونه به سیستم گوارشی نشخوارکنندگان جمعیت قابل ملاحظه ای را تشکیل نخواهند داد. و یا وجود گونه های خاص قارچی مانند جنس ماکروپوس (*Macropus*) با گونه های *M. rufus*، *M. giganteus* و *M. fuliginosus* در کانگروها هرگز در چرای همزمان با سایر دام ها به سایر گیاه خواران به خصوص دام های اهلی انتقال نیافته و یا در صورت انتقال توسعه نمی یابند. نمونه دیگری از این مثال ها می توان به تنوع بالای گونه های قارچی شکمبه دام هایی که در مراتع مناطق گرمسیری در مقابل دام های مراتع سردسیر و هر دو در مقابل دام های صنعتی واقع در جایگاه های صنعتی دیده می شود، اشاره کرد. نهایتا اختصاصی شدن قارچ ها ناشی از اختصاصی شدن دام براساس فشار اقلیم گیاهی فرضیه مهمی در تعیین جمعیت قارچ های شکمبه محسوب می شود.

۳-۷-۶ اثر خوراک مصرفی بر جمعیت قارچ ها

کارشناسان بر این باورند که خصوصیات مخزن تخمیر برگرفته از خوراک مصرفی و خوراک مصرفی تا حدود زیادی متاثر از شرایط اقلیمی میزبان خواهد بود. تنوع خوراک مصرفی تاثیر بسیار شگرفی بر فعالیت های قارچی و جمعیت آنها خواهد گذاشت. برای شناسایی اثر خوراک بر جمعیت و فعالیت های قارچی لازم است اقلام جیره غذایی به صورت تک تک بررسی گردند:

۱-۳-۷-۶ علوفه ها

گزارشات نشان می دهد فعالیت و جمعیت قارچ های بی هوازی شکمبه با مصرف علوفه و افزایش تناسب آن در مقابل سایر اقلام غذایی جیره مصرفی افزایش معنی داری می یابد. به عبارتی حضور فیبر در جیره عامل اصلی در افزایش جمعیت قارچی محسوب می گردد. در این میان، کیفیت علوفه مصرفی همانند کمیت بر جمعیت تالوس قارچ ها موثر می باشد (جدول ۵-۶). بدین معنی که هر چقدر بافت مستحکم گیاه بیشتر گردد، به دلیل ضعف باکتری ها در برداشت مواد غذایی، قارچ ها رشد بیشتری بر روی آنها خواهند کرد. براساس این فرضیه آزمایشات گسترده ای آغاز و معلوم گردید که فعالیت قارچی بر روی گیاهان بالغ بیشتر از گیاهان نو رس و تازه انجام می گیرد.

جدول ۵-۶ اثر کیفیت خوراک مصرفی بر جمعیت زئوسپورها در شکمبه (براساس رقت $۱۰^{-۳}$ میلی لیتر مایع شکمبه).

ردیف	جیره مصرفی	تعداد زئوسپور
۱	سیلوی گراس	۴۰
۲	ری گراس	۴۰
۳	کاه گندم	۲۰
۴	سیلوی ذرت	۷
۵	سیلوی ذرت + مواد متراکم	۸
۶	چغندر	۲
۷	جو + گندم	۰

برگرفته از: Orpin, 1994

علاوه بر بافت گیاه، کیفیت علوفه مصرفی براساس ایجاد تعادل در عناصر مواد غذایی می تواند اثر علوفه بر جمعیت قارچ ها را دو چندان کند. در همین این راستا تحقیقات نشان می دهد که فعالیت های قارچی بر روی علوفه های لگوم بالغ شده از گراس های بالغ بیشتر است. این علت می تواند علاوه بر پلی ساکاریدهای سلولز و همی سلولز به پروتئین علوفه نیز باز گردد. در صورت مصرف علوفه های فاقد سلولز و همی سلولز کاهش جمعیت قارچی حتمی خواهد بود. اندازه علوفه مصرفی می تواند معیار موثر دیگری بر جمعیت قارچ ها باشد. هر چقدر اندازه ذرات ریزتر گردد احتمال عبوری شدن قارچ ها از شکمبه به دلیل افزایش زئوسپورها بیشتر می شود. اما برای فعالیت بیشتر قارچ ها لازم است علوفه های مصرف شده خرد و سائیده گردند، تا قارچ بتواند با نفوذ بر آنها اقدام به توسعه نماید. لذا فرآوری های فیزیکی علوفه باید به اندازه مناسب و برش های سطح علوفه منجر گردد. همچنین، پاره ای از تحقیقات نشان داده است که در صورت مصرف علوفه فرآوری شده توسط سیلوسازی در کوتاه مدت سبب بهبود

جمعیت قارچ های شکمبه می شود. این افزایش در جمعیت می تواند ناشی از فعالیت اولیه دسته ای از قارچ ها و سایش شدید علوفه در هنگام سیلوسازی در مخزن سیلو بوده باشد که شرایط را برای فعالیت مجدد در شکمبه آماده نموده است. اما مصرف بالای علوفه های سیلو شده در طولانی مدت به دلیل آزادشدن مواد قندی و دسترسی بالای باکتریایی آن کاهش جمعیت قارچ های شکمبه را رقم خواهد زد.

۶-۷-۳-۲ دانه ها

قارچ های شکمبه مانند جنس های نئوکالیماستیکس، پیرومایسس و اورپینومایسس به دلیل ترشح آنزیم آمیلاز قادر به فعالیت های هضمی مواد نشاسته ای داخل غلات می باشند، اما اضافه کردن اقلام دانه ای با نسبت ۵۰ به ۵۰ می تواند به طور تقریبی ۸۰ درصد فعالیت های هضمی و جمعیتی قارچ ها حذف نماید. اما پایداری و حضور قارچ ها در شکمبه وجود داشته و فقط در مصارف طولانی مواد پرتراکم مانند جو و گندم قارچ ها کاملا از شکمبه شسته خواهند شد (جدول ۴-۶). البته دوره بازگشت قارچ ها به دلیل کثرت آنها در محیط پیرامونی دام و خوراک سریع می باشد. افزایش مصرف مواد پر تراکم سبب کاهش فعالیت های رویشی قارچ شده و در ابتدا سبب افزایش فعالیت های حرکتی و در نهایت سبب کاهش عمده در مجموعه تالوس قارچ خواهد شد. تصاویر الکترونی نشان می دهد که نحوه تجزیه مواد پر تراکم در قارچ ها متفاوت بوده و قارچ ها برای نفوذ در دانه های متراکم ابتدا به بخش پروتئینی دانه نفوذ و سپس اقدام به تجزیه گرانول های نشاسته می نمایند. توانایی قارچ ها برای هضم دانه های غلات تابع دو عامل نوع دانه و گونه قارچی می باشد. با این وجود همچنان در فعالیت های هضمی مواد پر تراکم توسط قارچ ها اتفاق نظر دیده نمی شود.

۶-۷-۳-۳ دفعات خورا ک دهی

استفاده از خوراک های متعادل (ترکیبی مناسب از علوفه به مواد متراکم) می تواند در ثبات حضور قارچ ها و فعالیت های هضمی آنها موثر واقع شود. آزمایشات نشان داده است که هر چقدر دفعات خوراک دهی بیشتر شود، به دلیل مساعد شدن شرایط محیطی مخزن و حضور بیشتر مواد مغذی، جمعیت قارچ ها براساس واحد تالوس افزایش خواهند یافت. البته دفعات بالای خوراک دهی با خوراک غنی از مواد متراکم (غلات و کنجاله ها) نتیجه معکوس داشته و سبب حذف کامل قارچ ها خواهد شد. این کاهش یا حذف قارچ ها می تواند ناشی از افت شدید pH و عبوری شدن ذرات غذایی همراه با زئوسپور باشد.

۶-۸ اثر متقابل قارچ ها با سایر میکروارگانیسم های شکمبه

شکمبه در نشخوارکنندگان یک اکوسیستم پیچیده ای است که قدرت بالقوه برای مشارکت های میکروبی در آن مشاهده می گردد. شناسایی روابط موجود بین میکروب های شکمبه می تواند راهکارهای تغییر فلور میکروبی شکمبه و کنترل فرآیندهای شیمیایی آنها را مناسب تر و واقعی تر تشریح نماید. علاوه بر ارتباط قارچ با قارچ که به صورت مشارکتی و رقابتی در حال ادامه دادن است، روابط قارچ با باکتری ها و قارچ با پروتوزوئرها از روابط بسیار مهم در شکمبه محسوب می شود. اگر چه درباره روابط قارچ ها با یکدیگر اطلاعات کافی دیده نمی شود، اما فعالیت های مشارکتی قارچ برای هضم فیبر به خصوص لیگنین نمود عینی تری در مقایسه با فعالیت های رقابتی آنها جهت کسب مواد غذایی دارد. اما فعالیت های رقابتی براساس عقیده کثیری از محققین بیشتر متوجه مواد تخمیری و سم های به جا مانده از کلونی قارچ ها برای سایر کلونی ها می باشد. به همین دلیل ایجاد کلونی های متفاوت در کنار یکدیگر در محیط های کشت مصنوعی و طبیعی سخت و گاه غیر ممکن به نظر می آید. البته باید ذکر کرد که تمامی فعالیت ها و روابط میکروارگانیسم مورد بررسی، در شرایط آزمایشگاهی و در محیط کشت های خالص یا مخلوط انجام گرفته است. حال آیا این روابط در شرایط طبیعی و در مخزن شکمبه به همین شکل دیده می شود و یا نه؟ به دلیل آنکه قدرت فعالیت های تخمیری در هر سه گروه میکروبی تا حدودی مشابه می باشد، می توان انتظار داشت که هر سه گونه میکروبی بتواند بر دیگری غلبه نماید. در این غالبیت کمیت و کیفیت خوراک مصرفی و شرایط مخزن مانند نرخ عبور اثر بسزایی خواهند داشت.

۱-۸-۶ رفتار متقابل قارچ ها با باکتری ها

در شکمبه بیشتر فعالیت های چرخه ای قارچ جهت هضم مواد مغذی به خصوص فیبرها، ارتباط مستقیم با باکتری دارد. تحقیقات نشان می دهد روابط بین قارچ و باکتری بیشتر به شکل هم کوشی (*Synergism*) انجام می گیرد. در این بین روابط همزیستی بین قارچ و باکتری های متان زا از وفور بالاتری برخوردار است. علت این مسئله مربوط به فراهم سازی چرخه ای است که باکتری بواسطه آن اقدام به تولید متان و استات می نماید.

انرژی بیشتری که توسط قارچ ها تولید می گردد، مسیر متابولیکی شکمبه را تغییر داده و این تعویض مسیر شیمیایی سبب می شود باکتری ها به خصوص رومینوکوکوس فلاووفاسینس، متانوسارسینا بارکری و متانوبروی باکتر رومینانتیوم اقدام به تولید متان از هیدروژن، دی اکسیدکربن، فورمات، استات و لاکتات آزاد شده توسط قارچ ها نماید. محصولات مهار کننده فعالیت های قارچی (لاکتات و اتانول) که از فعالیت کلونی قارچی حاصل می شوند، به عنوان دهنده الکترون و با کمک باکتری ها سبب تولید

استات و متان شده و از محیط خارج می گردند (جدول ۶-۶). باکتری ها با این عمل سبب پایداری قارچ ها در مخزن تخمیر می شوند. در بین قارچ ها جنس های نئوکالیماستیکس، پیرومایسس و سکومایسس اهمیت بیشتری در چرخه تولید متان دارند (در میان جنس های مذکور گونه های نئوکالیماستیکس فرونتالیس، پیرومایسس کومونیس و سکومایسس کومونیس از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند). در طی هم کوشی این دسته از قارچ ها با باکتری ها در محیط کشت توام، هضم مواد فیبری مانند سلولز، همی سلولز، زایلان و لیگنین (به مقدار اندک) بیشتر از کشت خالص قارچی یا باکتریایی می باشد.

جدول ۶-۶ اثر هم کوشی قارچ با باکتری در حضور هگزوزها*.

ردیف	تولیدات تخمیری	نئوکالیماستیکس فرونتالیس	نئوکالیماستیکس فرونتالیس + باکتری های متان زا
۱	اسید استیک	۷۲/۷	۱۳۴/۷
۲	اسید لاکتیک	۶۷	۲/۹
۳	اتانول	۳۷/۴	۱۹
۴	متان	۰	۵۸/۷
۵	دی اکسید کربن	۳۷/۶	۸۸/۷
۶	هیدروژن	۳۵/۳	۰/۰۵
۷	فورمات	۸۳/۱	۱

* مول تولید بر ۱۰۰ مول هگزوز مصرفی.

برگرفته از: Bauchop and Mountfort, 1981

از دیگر رفتارهای هم کوشی می توان به فعالیت قارچ نئوکالیماستیکس فرونتالیس در کنار باکتری سلنوموناس رومینانتیوم یا اورپینومایسس جویونی و یا در مجاور باکتری ویونلا آلکانسنس و مگاسفرا السدنی که هر دو مصرف کننده لاکتات هستند، در جهت هضم بیشتر سلولز بافت گیاهی اشاره کرد. همچنین می توان به فعالیت قارچ نئوکالیماستیکس و باکتری متانوبروی باکتر اسمیتی توجه نمود که در کشت توام هضم کننده زایلان ها می باشند.

اما، علاوه بر فعالیت های هم کوشی، رابطه رقابتی هم در بین باکتری ها و قارچ ها کاملا قابل مشاهده است. بطور مثال؛ باکتری های رومینوکوکوس آلبوس و بوتیری ویبریو فیبروسولونس با قارچ ها برای هضم فیبر در بافت گیاهی اغلب رقابت گسترده دارند. و یا قارچ های نئوکالیماستیکس با باکتری های فیبروباکتر ساکسینوژنز و رومینوکوکوس فلاووفاسینس در هضم سلولز رقابت می کنند. در طی رقابت مذکور باکتری های هضم کننده سلولز مسیر فعالیت قارچ های بی هوازی به خصوص گروه

ساکاروکلاستیک را توسط لاکتات تولیدی گرفته و هضم سلولز توسط قارچ را کاهش می دهند. محدود کننده های مذکور می تواند خارج سلولی و داخل سلولی بوده و در هر میکروارگانیسم عامل مذکور متفاوت است. بطور مثال؛ فعالیت هضمی کیتین (خارج سلولی) توسط باکتری های شکمبه به خصوص کلستریدیوم ترتیوم (*Clostridium tertium*) از مواردی است که محققین آن را فاکتور محدود کننده رشد قارچ و هضم بیشتر سلولز دانسته اند. باید در نظر داشت که روابط متقابل قارچ ها با باکتری ها علاوه بر نوع گونه باکتریایی و قارچی به شدت تابع ماده غذایی مصرفی می باشد. مثلا باکتری لاچنوسپیرا مولتی پارا با وجود داشتن فعالیت های هضمی کیتین اثر محدود کننده بر قارچ نئوکالیماستیکس نداشته و یا تغییر بافت کاه گندم به کاه ذرت سبب تغییر میزان محدودیت های قارچی یا باکتریایی شده است. محدود کننده ها ترشح شده می توانند به صورت (۱) جلوگیری از اتصال ماده غذایی به میکروب، (۲) توقف دهنده فرآیندهای شیمیایی و (۳) اثرات سمی مواد تخمیری بر فرآیند رشد میکروارگانیسمی عمل نمایند. معیار رقابتی فوق می تواند سبب کاهش فعالیت یک گونه میکروبی شده و جمعیت آنها را همراه با هضم مواد غذایی فیبری و حتی غیر فیبری تحت الشعاع قرار دهد. به همین دلیل است که تجزیه فیبر در کشت خالص قارچی بیشتر از محیط کشتی است که از مایع شکمبه بدون حضور باکتری (سانتریفوژ شده، حاوی آنتی بیوتیک و حرارت ندیده) تهیه می گردد.

علاوه بر باکتری های مصرف کننده هیدروژن سایر باکتری ها هم بر فعالیت های قارچی تاثیر می گذارند. روابط باکتری های شکمبه با قارچ ها به دلیل تنوع زیاد آنها بسیار پیچیده می باشد. اما با توجه به این پیچیدگی تحقیقات اندکی در این زمینه مشاهده می شود. این روابط می تواند به صورت مصرف تولیدات قارچی (مانند قندهایی که قارچ تخمیر نکرده و از بافت گیاهی آزاد شده اند) توسط باکتری ها و حتی بالعکس انجام گرفته و به فعالیت های شکارگری و انگلی ختم یابد. بطور مثال؛ باکتری سوکسینو ویبریو دکسترینوسولونس به کمک تحریک قارچ ها مانند پیرومایسس ها اقدام به هضم همی سلولز می نماید. همچنین، در طی بررسی های انجام شده مشخص گردید نرخ تجزیه پذیری زایلان توسط قارچ پیرومایسس کومونیس در کشت توام با باکتری پروتلا رومینوکولا افزایش یافت. این عمل مربوط به آزادسازی آرابینوز و زایلوز توسط قارچ و مصرف آن توسط باکتری می باشد. تحقیقات اخیر نشان داده است که بعضی از قارچ ها در برابر فعالیت ها و تهاجمات باکتری ها مقاومت از خود نشان می دهند. بدین صورت که قارچ های نئوکالیماستیکس فرونتالیس و پیرومایسس کومونیس با ترشح مواد خارج سلولی فعالیت تجزیه زایلان را توسط رومینوکوکوس فلاووفاسینس متوقف نموده اند. البته این مقاومت در برابر همه باکتری ها صورت نمی گیرد. تاثیر مواد ترشح شده از این دو قارچ بر باکتری رومینوکوکوس آلبوس بی معنی بوده و با حرارت دادن مواد مترشحه اثر آن بر باکتری رومینوکوکوس

فلاووفاسینس هم بی تاثیر خواهد شد. و یا دسته ای از باکتری ها به دلیل داشتن فعالیت های هضم کیتین (کیتینولایتیک) قابلیت تهاجم به قارچ ها را دارند. اما، در مجموع می توان گفت به دلیل غالبیت بیشتر باکتری ها بر تخمیر مواد مغذی شکمبه و اثر آنها بر قارچ ها، فعالیت تخمیری قارچ ها بر روی فیبر به حداکثر نخواهد رسید. از طرف دیگر خود قارچ ها برای کسب اسیدهای آمینه، ویتامین های گروه B و سایر مواد غذایی به باکتری ها محتاج می باشند.

۶-۸-۲ رفتار متقابل قارچ ها با پروتوزوئرها

از آنجا که در فعالیت های تخمیری شکمبه پروتوزوئرهای مژک دار اهمیت بالاتری در مقایسه با تاژک داران دارند، لذا مجموعه تحقیقات انجام شده بیشتر در این ردیف جای گرفته اند. روابط متقابل پروتوزوئرها با قارچ ها بیشتر در بخش مایع شکمبه مشاهده می شوند. پروتوزوئرها با هضم باکتری ها و بعضی از پروتوزوئرهای کوچک تر بر فلور میکروبی شکمبه اثر می گذارند. از طرف دیگر تحقیقات نشان داده است که پروتوزوئرها سبب افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی در شکمبه و ثابت ماندن خصوصیات فیزیکوشیمیایی محیط شکمبه می گردند. هر دو معیار اشاره شده عامل توسعه و رشد مطلوب تر قارچ های بی هوازی در شکمبه می شوند. پروتوزوئرها همانند قارچ ها هضم کننده فیبر بوده و هر دو در نواحی آسیب دیده بافت های گیاهی مشاهده می شوند. اما در اکثر اوقات مشاهده می شود که پروتوزوئرها به صورت یک عامل شکارگر ظاهر شده و قارچ ها را هضم و تجزیه می کنند. البته فعالیت های مشارکتی هم در بین این روابط گزارش شده است. با این وجود اطلاعات ارائه شده نشان می دهد که فعالیت هلوتریش ها بر روی فعالیت هضمی قارچ ها (به خصوص نئوکالیماستیکس در تجزیه فیبر) بی تاثیر بوده و فقط انتودینومورف ها با قدرت جلوی فعالیت های هضمی قارچ و حتی رشد آنها را گرفته است. همچنین کشت توام پروتوزوئر با گونه های قارچی که حاوی کیتین کمی می باشند (مانند پیرومایسس ها) نشان داده است که فعالیت هضم سلولز به مقدار کم تری در قارچ ها کاهش یافته است. اما امروزه مطالعات نشان می دهد که پروتوزوئرها به راحتی دیواره سلولی قارچ ها را هضم نموده (فعالیت کیتیناز) و قدرت هضم ریزوئید، زئوسپور و حتی اسپورانجیوم آنها را دارا می باشند. البته دسته ای از پروتوزوئرها در کنار قارچ های نئوکالیماستیکس مانند پاتریشیاروم دارای فعالیت های بی اثر و گاه مشارکتی می باشند.

گزارشات متناقض و متنوعی در روابط قارچ با پروتوزوئرها مشاهده می شود که به شدت تابع شرایط آزمایش (در آزمایشگاه یا مخازن طبیعی)، زمان نمونه گیری، کمیت و کیفیت خوراک مصرفی و در دسترس بودن آن می باشد. اما شکارگری پروتوزوئرها با مدارک غیر مستقیم مانند افزایش غلظت

قارچ با حذف پروتوزوئر (اگر چه با شبهاتی همراه است) و حضور زئوسپورها در واکوئل های گوارشی آنها اثبات شدنی است.

۹-۶ برای مطالعه بیشتر

- چمنی، م.، م. رضاییان، ج. ارشاد، پ. جامعی. (۱۳۸۲). جداسازی و شناسایی قارچ های بی هوازی موجود در شکمبه گوسفند و بز دراقلیم های گوناگون ایران. رسالهٔ دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

- Barr, D. J. S. (1995). Contributions on the morphology and taxonomy of some rumen fungi from Canada. Mycotaxon. (LIV): 203-214.
- Bauchop, T. (1979). Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. Applied and Enviromental microbiology. Vol, 38. No, 1. p: 148-158.
- Breton, A., A. Bernalier, F. Bonnemoy. (1989). Morphology and metabolic characterization of a new species of strictly anaerobic rumen fungus: Neocallimastix joyonii. FEMS Microbiol. Lett. (58): 309-14.
- Bryant, M. P. (1977). Microbiology of the rumen. Cornell University Press, Ithaca, N. Y.
- Calza, R. E. (1990). Regulation of protein and cellulose execration in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. C. Microbial, 21:109-115
- Chen, Y. C., S. D. Tsai, H. L. Cheng. (2007). Caecomyces sympodialis sp. nov., a new rumen fungus isolated from Bos indicus. Mycologia, 99: 125 -130.
- Church, D. C. (1988). The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall.
- Cronje, P. B. (2000). Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. Cabi publishing, ISBN 0 85199 4636.
- Dehority, B. A. (2003). Rumen microbiology. Nottingham University Press. ISBN 1 897676 99.
- Dore, J., D. A. Stahl. (1991). Phylogeny of anaerobic rumen chytridiomycetes inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparison. Can. J. Bot. (69): 1964-71.
- Fliegerova, K., J. Mrazek, K. Hoffmann, J. Zabranska, K. Voigt. (2010). Diversity of anaerobic fungi within cow manure determined by ITS analysis. Folia microbiologica 55: 319–325.
- Fliegerova, K., S. Paioutova, J. Mrazek, J. Kopecny. (2002). Special properties of polycentric anaerobic fungus anaeromyces mucronatus. ACTA Vet. BRNO. 71: 441-444.

- Gaillard, B., A. Breton, M. Dusser, J. Guillot. (1992). Contribution to the morphological, cytological and ultrastructural characterization of Piromyces Mae, a strictly anaerobic rumen fungus. Curr. Microbiol. (24): 159-164.
- Gaillard, B., A. Citron. (1989). Ultrastructural study of two rumen fungi: Piromonas communis and Sphaeromonas communis. Curr. Microbiol. (18): 83-6.
- Gold, J. J., L. B. Heath, T. Bauchop. (1988). Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, Caecomyces equi gen. nov. Biosystems. (21): 403-15.
- Griffith, G. W., E. Ozkose, M. K. Theodorou, D. R. Davies. (2009). Carbon source affects isolation efficiency of anaerobic rumen fungi. Fungal Ecology 2: 87–97.
- Griffith, G. W., S. Baker, K. Fliegerova, A. Liggenstoffer, M. Giezen, K. Voigt, G. Beakes. (2010). Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. IMA Fungus, volume 1, No 2: 181–185.
- Hespell, R.B., D.E. Akin, B.A. Dehority. (1997). Bacteria, fungi and protozoa of the rumen. International Thompson Press, New York.
- Ho, Y. W., I. Y. S. Khoo, S. G. Tan. (1994). Isozyme analysis of anaerobic rumen fungi and their relationship to aerobic chytrids. Microbiology. (140): 1495-1504.
- Ho, Y. W., N. Abdullah, S. Jalaludin. (1988). Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. Journal of General Microbiology, 134: 177-181.
- Ho, Y. W., D. J. S. Barr. (1995). Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. Mycologia. (87): 655-77.
- Hobson, P. N. (1989). The rumen microbial ecosystem, Elsevier Applied Science, London.
- Hobson, P. N., C. S. Stewart. (1997). The rumen microbial ecosystem. 2ed. Chapman & Hall, Suffolk, UK. ISBN 0 7514 0366 0.
- Hungate, R. E. (1975). The rumen microbial ecosystem. Annual Review of Ecology and Systematics 6: 39-66.
- Hungate, R. E. (1966). The rumen and its microbes. London: Academic Press.
- Kemp, P., D. J. Lander, C. G. Orpin. (1984). The Lipids of the rumen fungus *Piromonas communis*. J. General Microbiology. 130: 27-37.
- Klieve, A. V. (1996) Gut-inhabiting Fungi of Australian Herbivores. In Fungi of Australia Vol 1B. Fungi in the Environment, ABRS, Canberra.

- Liggenstoffer, A. S., N. H. Youssef, M. B. Couger, M. S. Elshahed. (2010). Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum Neocallimastigomycota) in ruminant and nonruminant herbivores. ISME Journal 4: 1225–1235.
- Lowe, S. E., M. K. Theodorou, A. P. J. Trinci. (1987). Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. J. Gen. Microbiol. (133): 1829-934.
- Lowe, S. E., M. K. Theodorou, A. P. J. Trinci. (1987). Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. Applied and Enviromental microbiology. Vol, 53. No, 6. p: 1210-1215.
- McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, K. J. Cheng. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72: 3004–3018.
- Mohammadabadi, T., M. Chaji. (2010). The Determination In Vitro Rumen Fungi Growth in Medium Containing Rice Straw Treated with Steam, Exogenous Enzyme and or Naoh by Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction. Journal of Biotechnology and Biochemistry. Volume 6, pp: 793–799.
- Mountford D. O., C. G. Orpin. (1994). Anaerobic Fungi. Dekker, New York.
- Novotna, Z., K. Fliegerova, J. Simunek. (2008). Characterization of chitinases of polycentric anaerobic rumen fungi. Folia Microbiol. 53 (3): 241-248.
- Obispo, N. E., B. A. Dehority. (1992). A most probable number method for enumeration of rumen fungi with studies on factors affecting their concentration in the rumen. J. Microbiol. Methods. 16:259–270.
- Ogimoto, K., S. Imai. (1981). Atlas of rumen microbiology. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- Orpin, C. G. (1994). Anaerobic fungi: Taxonomy, Biology, and distribution in nature. Pp.1- In: Mountfort, D. O. & C. G. Orpin (Eds). Anaerobic fungi biology, ecology, and function. Marcel Dekker, Inc. USA.
- Orpin, C. G. (1977). The rumen flagellate Piromonas communis: its life-history and invasion of plant material in the rumen. J. Gen. Microbiol. (99): 107-17.
- Ozkose, E. (2001) Morphology and molecular ecology of anaerobic fungi. PhD thesis, University of Wales, Aberyswyth.
- Ozkose, E., B. J. Thomas, D. R. Davies, G. W. Griffith, M. K. Theodorou. (2001) Cyllamyces aberensis gen.nov sp. nov., a new

anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. Canadian Journal of Botany 79: 666–673.

- Rezaeian, M. (1996). Assessment and distribution of anaerobic fungi in the ruminant gut. PhD thesis, University of Newcastle upon Tyne.
- Rezaeian, M., G. W. Beakes, D. S. Parker. (2004) Methods for the isolation, culture and assessment of the status of anaerobic rumen chytrids in both in vitro and in vivo systems. Mycological Research 108: 1215–1226.
- Rezaeian, M., G. W. Beakes, D. S. Parker. (2004). Distribution and estimation of anaerobic zoosporic fungi along the digestive tracts of sheep. Mycol. Res. 108 (10): 1227–1233.
- Russell, J. B. (2002). Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca, N.Y.
- Sakurada, M., D. P. Morgavi, Y. Tomita, R. Onodera. 1995. Chitinolytic activity of the anaerobic rumen fungus Piromyces communis OTS1. Curr. Microbiol. (31): 206-9.
- Sridhar, M., D. Kumar, S. Anandan, C. S. Prasad, K. T. Sampath. (2010). Morphological and molecular characterization of polycentric rumen fungi belonging to the genus orpinomyces isolated from Indian cattle and buffaloes. Research J. Microbiology 5 (7):581-594.
- Varga, G. A., E. S., Kolver. (1997). Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. J. Nutritional Sciences. p: 819-823.

فصل هفتم

طراحی عملکرد شکمبه

۷-۱ تاریخچه الگونویسی	۲۹۹
۷-۲ شاخص های اصلی الگونویسی در عملکرد شکمبه	۳۰۶
۷-۳ الگونویسی هضم فیبر	۳۲۲
۷-۴ الگونویسی فعالیت های تخمیری اسیدهای چرب فرار	۳۲۸
۷-۵ الگونویسی پروتئین میکروبی	۳۴۲
۷-۶ الگونویسی چربی ها در شکمبه	۳۵۲
۷-۷ الگونویسی اسیدیته در شکمبه	۳۵۵
۷-۸ الگونویسی تولید گاز در شکمبه	۳۵۸
۷-۹ الگوهای ترمودینامیکی در شکمبه	۳۶۳
۷-۱۰ برای مطالعه بیشتر	۳۷۵

طراحی عملکرد شکمبه

کارشناسان سال ها در تلاش هستند که بتوانند یک طراحی دقیق و در عین حال ساده از روندهای فیزیکی و شیمیایی تخمیر شکمبه برای تغییر مدیریت پرورش در زمینه های عملکرد دام و خوراک مصرفی ارائه دهند. اما تحقق این عمل بدلیل وجود عوامل ناشناخته فراوان در شکمبه مشکل و به صورت مطلوب انجام نگرفته است. فعالیت طراحان در جهت الگونویسی عملکرد شکمبه بیشتر صرف شناسایی کارآیی مواد مصرفی بخصوص انرژی، پروتئین، چربی و مسیرهای انتقالی آنها شده است. این در حالی است که طراحی فعالیت های تخمیری شکمبه بصورت واقعی مدیون بسیاری از عوامل مانند شرایط محیطی شکمبه، اثرات متقابل خوراک، تعادل نسبت های غذایی، تجمع گونه های متفاوت میکروبی در شکمبه، فصل و عوامل اقلیمی و دهها عوامل دیگر می باشد. بطور مثال؛ کارآیی انرژی در زمان وجود نیتروژن و یا فقدان آن کاملا متفاوت بوده و منبع انرژی مصرفی (ساختاری یا غیر ساختاری) با نوع نیتروژن در دسترس هم در روند تخمیر اثر بسزایی خواهند داشت. لذا درک صحیح عوامل موثر بر تخمیر می تواند طراحی الگوی تخمیر را به واقعیت نزدیک تر نماید. شاید علت بروز این گونه تفاوت ها در طراحی های عملکرد شکمبه پیوسته بودن فعالیت های همه جانبه تخمیر با یکدیگر و پویا بودن آنها در هر لحظه از آزمایش می باشد.

۷-۱ تاریخچه الگونویسی

نظریه الگونویسی فعالیت های شکمبه توسط محققین جهت ساخت دستگاه های بیورآکتور آغاز گردید. از آنجا که تمامی قوانین ریاضی بکار رفته در بخش های صنعتی تخمیر مشابه و ساده تر شده قوانین موجود در تخمیر شکمبه ایی است، استفاده از شکمبه در کشف معادلات تخمیر مرسوم گردید. با این وجود نزدیک به یک قرن است که کارشناسان جهت ارائه یک الگوی کامل از مجموعه فعالیت های شکمبه (فیزیکی یا شیمیایی) در تلاش هستند. اما به دلایلی نتوانسته اند بطور کامل فعالیت خود را گردآوری و یکپارچه نمایند. کارشناسان مهمترین علل شناخته شده در زمینه سد ارائه یک الگوی کامل از فعالیت های شکمبه را تفاوت محل های جغرافیای و آثار مستقیم آن بر خواص ژنتیکی موجودات، نبود ضوابط یکسان آزمایشگاهی به دلیل تفاوت های مالی طرح ها، فقدان لوازم با ضرایب یکسان اندازه گیری در مراکز تحقیقاتی، تفاوت دیدگاه های متخصصین در زمینه الگونویسی فعالیت های شکمبه به دلیل تقدم و تاخر دادن فاکتورهای اساسی، وجود فاکتورهای فراوان و گاه ناشناخته در تخمیر بی هوازی و تنوع خوراک مصرفی می دانند. ولی با همه این موانع کارشناسان مبادرت به فعالیت های آزمایشی نموده و الگوهایی را براساس توانمندی خود ارائه داده اند. تقریبا در ۳۰ سال اخیر طراحی و

الگونویسی دستگاه گوارش بخصوص در شکمبه تغییرات شگرفی نسبت به زمان های گذشته داشته است. بطور مثال؛ چرخش فعالیت الگونویسی از حالت ثابت به حالت پویا و متحرک، از حالت آزمایشگاهی به حالت طبیعی و یا از حالت فعالیت خطی شکمبه به فعالیت های غیرخطی میکروبی مهمترین تغییر دیدگاهی محسوب می شود.

از آنجا که فعالیت های شکمبه همواره براساس تعادل رفتاری بین میکروارگانیسم ها، تولیدات نهایی و میانی آنها، کمیت و کیفیت خوراک مصرفی و خصوصیات بافتی-جذبی دستگاه گوارش صورت می گیرد، لازم است در شکل گیری یک الگوی فعالیتی شکمبه به موارد فوق بصورت رابطه طولی × عرضی نگاه شود تا خصوصیاتی چون رشد و تجدید نسل میکروب ها، حد مجاز فعالیت های ساخت-تخریبی و اثرات متقابل تولیدات تخمیری در دستکاری های شکمبه ای بیشتر نمایان گردد. تحقیقات درباره طراحی عملکرد شکمبه امروزه بدلیل موارد اشاره شده به سمت تحریک میکروب های شکمبه و نقش کلیدی آنها در روندهای تخمیر سوق پیدا کرده است. این نوع طراحی سبب شده است که محققین فهم مناسب تری از وظایف شکمبه بدست آورند و ساده تر بتوانند رفتار میکروارگانیسم ها و تحولات پیرامونی آنان را پیش بینی کنند. اما از آنجا که طراحی الگوهای مذکور وابسته به مسائل ریاضی بوده و تمامی مسائل موجود در یک موجود زنده را نمی توان در غالب ریاضی بیان کرد، پس محدودیت های در زمینه تولید معادلات فعالیت تخمیری دیده خواهد شد. لذا، کارشناسان برای کاهش این محدودیت ها و رفع موانع اولیه در فهم الگونویسی فعالیت های تخمیری دو مرحله اساسی تعریف نموده اند. اولین مرحله در اجرای طراحی الگوهای ریاضی تخمیر، بسط ساده روند در حالت نمودار یا اشکال هندسی می باشد. در این حالت می توان کل پروسه های تخمیر را بصورت مجزا و ترکیبی بیان و شاخصه های تخمیر را بصورت واقعی تشریح نمود. دومین مرحله از طراحی الگوی ریاضی تخمیر، تعیین ارزش های هر یک از پارامترها در الگو می باشد. این مرحله سبب صحت ارزش های بکار رفته در شبیه سازی تخمیر برای مطالعات آینده می شود.

۱-۱-۷ کاربرد عملی الگونویسی

الگونویسی در اصل بیان ریاضی یا قوانین متناوب قابل شبیه سازی از فعالیت های شکمبه است که جهت فهم بهتر تخمیر ارائه می شود. در الگونویسی باید فعالیت های زیستی موجود زنده بصورت علمی و قانون پذیر سازماندهی یا سطح بندی شود. این سازماندهی بایستی برای همه افراد قابل فهم و در قوانین ریاضی قابل پردازش باشد. برای فعالیت های زیستی در غالب دام اهلی یک سطح بندی کاملا اصولی

ارائه شده است (جدول ۱–۷)، که می تواند به همه موجودات زنده تعمیم داده شود. این نوع سطح بندی یا سازماندهی ویژگی های خاص خود را دارد که عبارتنداز:

۱- هر سطح مفهوم و زبان خاص خود را دارد. بطور مثال؛ شرایط تولیدات دامی مانند افزایش وزن زنده بدن تفاوت معنایی زیادی با رشد سلولی و یا ساختار تک سلولی دارد.

۲- هر سطح دارای وابستگی دامنه داری از سطوح پایین تر خود می باشد. این روند نشان می دهد که پاسخ الگوی ارائه شده در سطح i به نسبت ناشی از پاسخ سطح زیر دست i-1 می باشد.

۳- موفقیت اجرایی کردن عملیات در یک سطح به شدت وابسته به شایستگی سطح زیرین می باشد. اما لزوما عملیات بدون وجود سطح زیرین از بین نخواهد رفت. بطور مثال؛ میکروارگانیسم ها می توانند بطور مناسب از شکمبه خارج و در محیط کشت رشد مطلوبی کنند، که تابع وضعیت شکمبه و سلامتی دام می باشد. اما لزوما شکمبه و دام تاثیر چندانی بر رشد میکروب در محیط کشت آزمایشگاهی نخواهد داشت.

جدول ۱–۷ نمونه سطوح الگونویسی.

ردیف	سطوح	توضیحات هر سطح	پراکنش الگو در ساختار
۱	$i + 3$	مجموعه سازماندهی شده مانند گله و دسته دام ها	الگوی تلنومیک
۲	$i + 2$	یک واحد از تشکیلات سازماندهی شده مانند یک دام	
۳	$i + 1$	دستگاه مانند دستگاه گوارش، دستگاه گردش خون و ...	الگوی تجربی
۴	i	بافت مانند بافت چربی، بافت پروتئینی و ...	
۵	$i - 1$	سلول	الگوی تناوبی
۶	$i - 2$	اندامک های سلولی	
۷	$i - 3$	ماکروملوکول ها	

براساس همین ساختار شناسی در الگونویسی می توان به طور خلاصه سه نوع الگو را در طرح های تحقیقاتی استفاده نمود. الگوهای مورد استفاده شامل الگوهای تلنومیک (Telenomic model)، الگوهای تجربی (Empirical model) و الگوهای تناوبی (Mechanistic model) می باشد. الگوهای تلنومیک نقش کمتری در فعالیت های بیولوژیکی بازی می کنند و فعالیت های این الگو در سطوح بالایی ساختار ارائه شده مانند $i + 1$ شکل می گیرد. کاربرد این الگو در ارزیابی های رفتاری موجود زنده وسیع تر می باشد. اما الگوهای تجربی بیشتر در لایه های میانی ساختار ارائه می شود و در سطوح انفرادی شکل می گیرد. در الگوی تجربی ارزیابی بیشتر براساس آزمایشات و مشاهدات بدست آمده صورت گرفته و در اجرای الگو نیازی به نظریه های بیولوژیکی از قبل طراحی شده نیست.

الگوهای تجربی اغلب اوقات دارای منحنی های چند نقطه ایی می باشند و می توانند بطور مثال؛ جهت مصرف اختیاری دام ها کاربرد وسیع داشته باشند. معادله ۱-۷ نمونه الگوی تجربی در مصرف خوراک اختیاری می باشد:

معادله ۱-۷: $$I = a_o + a_1W + a_2 (dW/dt) + a_3 D$$

I = مقدار مصرف خوراک   D = کیفیت خوراک اندازه گیری شده

W = وزن زنده دام $a_o,a_1,\ldots,a_3$ = پارامترهای در حال اندازه گیری

الگوهای تناوبی برعکس سایر الگوهای ارائه شده در لایه های زیرین ساختار تشکیلاتی قرار می گیرند (جدول ۱-۷) و جهت فهم علل و سبب روندهای تولیدی گام بر می دارند. یک الگوی تناوبی براساس مشاهده ساختار تشکیلات تحت بررسی، تقسیمات کلیدی در درون آن و آنالیز رفتار کل سیستم در شرایط خاص هر یک از اجزا و روابط بین آنها ایجاد می شود. بطور مثال؛ شرح یک الگوی تناوبی در مصرف خوراک و کارآیی آن جهت رشد می تواند به ۵ بخش مجزا و در عین حال وابسته به هم (دارای اثرات متقابل) تجزیه شود. این ۵ بخش شامل دو مخزن بدنی (پروتئین و چربی)، دو مخزن خونی (اسیدهای آمینه و متابولیت های کربنی) و یک مخزن هضمی (کیسه شکمبه) باشد.

۲-۱-۷ اصول الگونویسی

تحقیقات انجام شده درباب الگونویسی فعالیت های شکمبه همواره بر پایه اصول مشارکتی میکروب ها و میزبان آنها شکل گرفته شده است. اساسی ترین بحث درباره اینگونه طراحی ها فهم روابط پیچیده میکروارگانیسم ها و تعیین راه های تغییر جمعیت های آنها برای انجام فعالیت های خاص تخمیری و جذب تولیدات میکروبی در شکمبه می باشد. در کنار این فهم لازم است درباره کنترل فعالیت های روند بی هوازی، روش های سم زدایی، هضم مواد غیرمتعارف، جمعیت های میکروبی و نسبت آنها، نرخ جذب مواد تولیدی، نرخ رشد میکروبی و فعالیت واقعی هر یک از آنها آگاهی لازم وجود داشته باشد. تحقیقات درباره الگونویسی فعالیت های پیچیده میکروبی نشان داده است که جمعیت میکروبی در هر زمان وام گرفته از جمعیت قبلی آنها می باشد. این جمعیت میکروبی پویا به شدت وابسته به نرخ رشد خود بوده و بوسیله رقابت پیشرفته میکروارگانیسم ها در کسب مواد مغذی تعیین می شود. برهمین اساس میکروب ها محیط کوچک اطراف خود را که بخش هضم بیرونی آنها محسوب می شود را بشدت اشغال و شرایط آن را با محیط پیرامونی خود تغییر می دهند. بنابراین میکروب ها از طریق ایجاد محیط غیر متجانس با سایر نقاط دیگر شکمبه منتشر و می توانند در فاز مایع، فاز ذرات خرد معلق و دیواره سلولی بصورت تک واحدی فعالیت نمایند. درجه غیر متجانس میکروبی بوسیله بررسی موفقیت

میکروارگانیسم و همزیستی یا ارتباط وی با سایر میکروب ها در شرایط بحرانی تعیین می شود. برای طراحی هر الگوی فعالیتی در شکمبه لازم است روند کار مورد بررسی و مبانی آن مشخص گردد. این بررسی می تواند شامل:

۷-۱-۲-۱ فرضیه و تعاریف

برای انجام هر کار تحقیقی لازم است در ابتدا مبانی فکری و سئوالات تحقیقی دسته بندی و راه کارهای احتمالی رسیدن به آن بررسی گردد. لذا جهت طراحی یک الگو لازم است بدانیم که از این دستاورد چه چیزی خواهیم فهمید؟ تولیدات تخمیری چه می تواند باشد و میزان فعالیت گوارشی چقدر خواهد بود؟ چه تعداد گونه میکروبی درگیر الگو خواهند شد و وضعیت توده میکروبی، نسبت گونه ها و ارتباط هر گونه با پروسه مزبور تا چه حد خواهد بود؟ تغییرات جیره و تغییر گونه های میکروبی چه تاثیری می توانند بر روند الگوی هضم و جذب داشته باشند؟ این گونه سوالات کمی و کیفی می تواند راهبردی برای جلوگیری از سرگردانی های علمی باشد که براساس روش کار و قدرت فعالیت طراحی دسته بندی می شوند. با ارائه سوالات و فرضیه های صحیح است که می توان یک طراحی مطلوب و دقیق از فعالیت های شکمبه ارائه نمود. بطور مثال؛ بعضی از همین سوالات می تواند تحت حالت های ورود غلظت ثابت مواد مغذی در واحد زمان جواب داده شوند، لذا طراحی فعالیت هضمی در آنها مستلزم ایجاد شرایط پایدار بنام الگوی *Steady state* می باشد. و یا بعضی سوالات در الگوی آزمایشگاهی (*In vitro*) و بعضی دیگر در الگوی مزرعه ای (*In vivo*) جواب داده می شوند. اهمیت دیگر این نوع سوالات این است که می تواند یک شرح و تفسیری جزئی از میزان اطلاعات فرد در زمینه آزمایشی مانند طراحی فعالیت های هضمی ارائه دهد. بطور مثال؛ این شرح و تفسیر می تواند میزان اطلاعات فرد درباب تغییرات ناگهانی و یا تجمیع اثر حالات مختلف بر فعالیت شکمبه را برای تکمیل تر شدن الگوی طراحی شده نشان دهد. همچنین، این سوالات می تواند توضیحی از فاکتورهای مورد بررسی ارائه دهد که تعیین کننده روش مورد آنالیز الگو می باشد. مثلا، در شرایط دینامیکی غیرپایدار شکمبه، قدرت تغییر اندازه مخزن تخمیر، نرخ رقت و کارآیی رشد وجود دارد که بیانگر خاصیت جمعیت میکروبی در هر زمان می باشد.

در هنگام طراحی الگوی فعالیت های هضمی لازم است طبیعی بودن شرایط آزمایش کاملا رعایت گردد. از آنجا که پس از نتیجه گیری می خواهیم فاکتورهای مورد بررسی را به فعالیت های هضمی جاندار در شرایط طبیعی تعمیم دهیم، نیاز است فعالیت های هضمی و ترکیب گونه های میکروبی تحت حالات عادی مشابه با شرایط طبیعی دام مثلا مصرف خوراک در مرتع انجام گیرد. بدین معنی که الگوی مصرف خوراک در دام ها ممکن است به صورت امری تکرار پذیر در مدت ۲۴ ساعت تلقی

شود، اما همین قاعده می تواند به شدت وابسته به فراوانی، ترکیب و تکرار مصرف خوراک و هر حالت آب و هوایی پیشامده باشد.

۲-۲-۱-۷ متغیرهای مورد بررسی در الگوها

متغیرها منابع آزمایشی جهت کشف فعالیت های هضمی و جمعیت میکروارگانیسم ها در یک الگوی طراحی شده می باشند. متغیرها گاهی از هم مجزا و یا دارای روابط دو یا چند طرفه هستند. بیشترین متغیرهایی مورد بررسی در یک الگوی تخمیری شامل:

۱. تیمار آزمایشی

- بین گونه های مختلف حیوانی با شرایط یکسان
- بین حیوانات یک گونه حیوانی در زمان یا دوره های متفاوت
- بین حیوانات یک گونه حیوانی با زمان یکسان اما با پرورش متفاوت
- بین حیوانات مشابه در یک دوره پرورشی و حالات یکسان (بیشتر آزمایشات در این طبقه جای می گیرند)
- بین تخمیرکنندگانی که با یک ماده تلقیحی یکسان شروع بکارکردند
- درون یک حیوان خاص در زمان های چرخشی

۲. جیره مصرفی

- بین جیره های با اجزای متفاوت
- بین جیره های با اجزای یکسان اما فرآوری های متفاوت
- بین سطوح مختلف مصرف (مصرف اختیاری یا اجباری)
- بین الگوهای مصرف خوراک
- بین اجزای تشکیل دهنده خوراک های متعارف و غیر متعارف

۳. زمان نمونه گیری

- در یک زمان خاص وابسته به یک رژیم غذایی
- در چندین زمان مختلف از یک دوره مصرف خوراک

۴. محل نمونه برداری

- از یک محل خاص در مخزن تخمیر
- از چندین موقعیت مکانی در مخزن تخمیر

۵. شرایط نمونه گیری

- بین نمونه های مخلوط شده از کل محتویات مخزن تخمیر
- بین نمونه های گرفته شده از بخش مایع
- بین نمونه های گرفته شده از بخش خرد شده ذرات
- بین نمونه های استخراج شده از طریق روش های مایع گیری مانند سانتریفوژ کردن

حالت های آزمایشی، نحوه تیمار بندی، نمونه گیری های صحیح و سایر متغیرهای پیش بینی شده در مسیر آزمایشی مانند اثرات متقابل متغیرها (مانند اثر متقابل خوراک مصرفی بر نوع و نحوه نمونه گیری) می تواند سبب شناسایی دقیق تر فعالیت های هضمی در یک الگو طراحی شده شود. اگر تمامی مراحل طراحی براساس پروتکل تایید شده توسط مراجع ذیصلاح صورت گیرد، این امکان را می دهد که تمامی تحقیقات در یک راستا قرار گرفته و قابلیت قیاس توسط الگوهای ریاضی را پیدا نماید.

۳-۲-۱-۷ واحد آماری

از مهمترین اجزا در طراحی یک الگو تاسیس واحدهای آنالیز آماری است که بتوانند هر یک از متغیرها را بصورت جداگانه و ترکیبی آنالیز آماری دقیق نماید. نوع آزمایشات و طراحی الگوهای فعالیتی آنها همواره متاثر از نوع آرایش قرار گیری متغیرها مانند گونه حیوانی، جیره مصرفی، شرایط محیطی، زمان، حالت های فیزیولوژیکی و یا هر شرایطی که براساس نوع الگو ارائه شده است، می باشد. هر نوع متغیری که براساس تاثیر آن بر تیمار انتخاب شود، تحت اثر زمان و نوع نمونه برداری قرار می گیرد. زمان نسبت به نوع نمونه برداری از اهمیت بیشتری در قیاس الگوهای فعالیت تخمیری دارد.

الگوهای آماری بکار رفته در فعالیت های شکمبه (براساس زمان) شامل(۱) الگوهای آماری برپایه زمان های مشابه از یک دوره آزمایشی و (۲) الگوهای آماری برپایه زمان های چرخشی می باشد. در زمان های مشابه بیشترین الگوی آماری بکار رفته طرح بلوک کاملا تصادفی و فاکتوریل بوده است. در بلوک کاملا تصادفی فاکتور الف مانند خوراک به دلیل تاثیر پذیری از فاکتور ب مانند سن دام طبقه بندی و هر دو در مقابل هم و مجزا بررسی می شوند. اما در فاکتوریل فاکتور الف مانند خوراک در مقابل چند فاکتور مانند فرآوری خوراک، سن، دما و ... بررسی می گردد. همچنین الگوی آماری براساس زمان چرخشی از دو طرح آماری مربع لاتین و طرح های متقاطع استفاده می نماید. در هر دو طرح زمان چرخشی واحد آزمایشی از تمامی تیمارهای ایجاد شده بهره مند می گردد (جدول ۲-۷). در این روش میزان دقت آماری افزوده شده و با کمترین واحد آزمایشی می توان الگوی فعالیت های شکمبه را ارائه نمود. در نهایت لازم است بدانیم که برای هر الگوی آزمایشی چهار اصل کلی وجود دارد که عبارتنداز:

جدول ۲-۷ طراحی الگوی آماری مربع لاتین.

	دوره اول	دوره دوم	دوره سوم	دوره چهارم
تیمار اول	واحد آزمایشی ۲	واحد آزمایشی ۱	واحد آزمایشی ۳	واحد آزمایشی ۴
تیمار دوم	واحد آزمایشی ۴	واحد آزمایشی ۲	واحد آزمایشی ۱	واحد آزمایشی ۳
تیمار سوم	واحد آزمایشی۳	واحد آزمایشی ۴	واحد آزمایشی ۲	واحد آزمایشی ۱
تیمار چهارم	واحد آزمایشی ۱	واحد آزمایشی ۳	واحد آزمایشی ۴	واحد آزمایشی ۲

۱- کل حالات آزمایشی باید در هر الگویی بیان و تفسیر گردد. بطور مثال؛ تغییرات اندک و جزئی جیره مصرفی تا حذف یک واحد آزمایشی باید بطور کامل تابع الگوی ارائه شده باشد و در صورت تغییر علت، منبع جایگزین و اثر این تغییر در روند آزمایشی کاملا بیان گردد.

۲- فاکتورهای خاص که سازنده فرضیه اصلی هستند بایستی بطور واضح بررسی شوند. زیرا علت تشکیل الگو همین فرضیه اصلی با فاکتورهای خاص خود می باشد. از مسائل حاشیه ای بجا مانده از الگو بایستی امتناع ورزیده و در صورت نیاز بررسی شوند.

۳- بجای تغییر دادن الگوی آماری در شرایط موجود زنده باید فاکتورها و حالاتی که سبب تغییر روند آزمایش می شود را شناسایی و در تصحیح الگو استفاده نمود. در اصل، ویژگی یک واحد آزمایشی باید از قبل شناسایی و براساس تاثیرات آن، الگوی آماری انتخاب تا تصحیحات لازم صورت گیرد.

۴- تعداد، زمان و مکان نمونه برداری باید تابع الگوی ارائه شده باشد. هر گونه تغییر در موارد یاد شده به دلیل داشتن اثرات متقابل با یکدیگر سبب بر هم زدن اثر الگو در روند آزمایشی می گردد (نکته: حتی المقدور از نمونه های گرفته شده در شرایط مناسب انبارداری بصورت نمونه دوم نگهداری شود).

۲-۷ شاخص های اصلی الگونویسی در عملکرد شکمبه

نظریات متفاوتی درباره وظایف و ساختارهای شکمبه وجود دارد که همه آنها براساس محوری شدن فعالیت های شکمبه، تفکیک پذیری قسمت های آن، ورودی و خروجی های منظم و کنترل شده در آن و تغییرات توده زنده مابین قسمت های مختلف این دستگاه طبقه بندی و قابلیت تشکیلاتی شدن آن را پذیرفته اند. لذا براساس همین تشکیلاتی شدن می توان الگوهای عملکردی برای آن طراحی کرد. اما برای افزایش کارآیی الگوهای طراحی شده لازم است ابتدا مفاهیم تخمیر و شرایط لازم آن درک گردد. در بالاترین سطح دانش تخمیر سه پارامتر (۱) تجزیه پذیری مواد مغذی، (۲) فعالیت های میکروبی و (۳) فعالیت های جنبشی ذرات همواره خودنمایی می کنند. این سه پارامتر می توانند به طراحی الگوی تخمیر شکمبه کمک و مسائل پیرامونی آن را چنان ساده نمایند که فهم آن برای همه

یکسان و قدرت تشریح روندهای تخمیر در آن پایدار باشد. اگر چه ساده سازی الگوهای تخمیر وابسته به نتایج گروه های متابولیسمی ثابت شده و نسبت های آن در محیط تخمیر می باشد. اما در نهایت ساده سازی الگوی عملکرد شکمبه و پارامترهای تخمیر می تواند تشریح کننده تفاوت الگوهای ارائه شده تخمیر براساس روندهای متابولیسمی گردد. لذا می توان براساس همین عقیده (سبب شناسی تخمیر) الگوها را طبقه بندی (ثابت در مقابل متحرک، آزمایشگاهی در مقابل مزرعه ایی و قطعی در مقابل اتفاقی) و نشانه گذاری کرد. این طبقه بندی ها براساس شاخص های موجود می تواند گفتگوها و مباحث علمی الگونویسی را منظم و مشکلات آنها را براساس نوع شرایط انجام شده گوشزد نماید.

۱-۲-۷ قابلیت تجزیه پذیری مواد مغذی

به جرائت می توان گفت که مهمترین مرحله الگونویسی عملکرد شکمبه تجزیه پذیری مواد غذایی و کارآیی خوراک توسط میکروارگانیسم ها و بالطبع نشخوارکنندگان است. برای شناسایی این فاکتور در طراحی الگوهای شکمبه کارشناسان از دو روش انکوباسیون در آزمایشگاه (*in vitro*) و کیسه گذاری در شکمبه (*in situ*) استفاده می کنند. لازم به ذکر است که استفاده از روش کیسه گذاری در تعیین تجزیه پذیری مواد غذایی پودری و مایع مناسب نمی باشد و مواد غذایی که دارای بخش شستشوی سریع (Washing loss) و یا فاز تاخیری بالایی هستند، موثر نخواهد بود. شستشوی سریع آن مقدار مواد غذایی محلول در شکمبه می باشدکه از طریق اندازه گیری مستقیم حاصل می شود و مشابه با بخش تجزیه پذیری سریع (a) می باشد. البته بخش تجزیه پذیری a را می توان از ترسیم نمودار تجزیه پذیری در توزیع نمایی (Exponential) بدست آورد. در حالیکه برای تشخیص شستشوی سریع این روش امکان پذیر نیست. تجزیه پذیری مواد غذایی در کیسه تخمیری می تواند براساس انتقال توده زنده از یک بخش ذخیره ای تجزیه نشده (Rt) به بخش ذخیره ای تجزیه شده (Dt) صورت گیرد. و نرخ آن را می توان از انتگرال خروج توده زنده از Rt (dRt / dt) و یا ورود توده زنده به Dt (dDt / dt) محاسبه نمود. همچنین، بیشترین رقابت ما بین الگوهای ارائه شده در باب هضم مواد غذایی به درک ارتباطات پیوسته نرخ های dRt / dt و dDt / dt وابسته می باشد، که در هنگام بررسی یک الگو بایستی ارتباط بین نرخ ها بررسی و سپس به مبانی ریاضی برگردانده شود. اما در نهایت ساده ترین شکل تشریح قابلیت تجزیه پذیری مواد مغذی در شکمبه براساس متغیرهای دینامیکی همین بخش ذخیره ای تجزیه شده می باشد که کارشناسان آن را مشابه توده میکروبی تولید شده و یا توده میکروبی حمله کننده به مواد غذایی می پندارند. براساس همین فرضیه می توان گفت که نرخ هضم مواد غذایی (dDt / dt) در

زمان t به طور خطی متناسب است با مقدار توده زنده تجزیه نشده یا سطوح قابلیت هضمی که در واحدهای زمانی یکسان بدست می آید:

معادله ۲-۷: $dDt / dt = Ka \times Dt$

معادله ۳-۷: $dRt / dt = -Ka \times (R_0 - Rt)$

Ka = قسمتی از نرخ تجزیه می باشد

R_0 = مقدار توده زنده تجزیه نشده در انتها

معادلات دیگری براساس این فرضیه وجود دارد که در جدول ۳-۷ ارائه گردیده است. لازم به ذکر است که بیشترین منابع آزمایشی در الگوهای تجزیه پذیری، نیتروژن و سپس کربوهیدرات مصرفی می باشد که می تواند براساس تاثیر نوع ماده غذایی و فعالیت های جنبشی آنها اثراتی بر الگو داشته باشند. اما در پی همین آزمایشات کارشناسان متوجه شده اند که در بیشتر مواقع مواد اولیه مصرفی در مقابل تجزیه پذیری میکروارگانیسم ها از خود مقاومت نشان می دهند.

جدول ۳-۷ معادلات ارائه شده جهت الگونویسی قابلیت تجزیه پذیری مواد غذایی.

شاخص اصلی در زمان بررسی معادلات هضم	معادلات ارزیابی قابلیت تجزیه پذیری (D*t*)	معادلات ارزیابی مواد باقی مانده (R*t*)
بخش قابل هضم مشابه با توده میکروبی که سبب افزایش نرخ تجزیه پذیری می شود	$Dt = e^{nt-1}$	$Rt = 2- e^{at}$
کاهش زمان نرخ تجزیه پذیری	$Dt = Dp \times (1-e^{-ci})$	$Rt = Dp \times -e^{kt}$
بخش غیرقابل تجزیه	Dp < 100 or < 1	$Rt = U + Dp \times -e^{kt}$
کلیات بخش های مواد مغذی	$Dt = \Sigma Dpi \times (1-e^{-cit})$	$Rt = U + \Sigma Dp \times -e^{kit}$
فاز تاخیری مجزا	$Dt = Dp \times (1-e^{-c(t-to)})$	$Rt = U + Dp \times -e^{k(t-to)}$
پیشرفت فاز تاخیری	تابع منحنی رشد	$Rt = U + Dp \times \exp(-k(1-e^{-ht})t)$

این مقاومت سبب تقلیل نرخ تجزیه پذیری مواد مغذی در واحد زمانی شده و یا بخش فاز تاخیری قبل از تخمیر را افزایش می دهد. برای شناسایی بهتر این مکانیسم معادلاتی (همانند جدول ۳-۷) طراحی که سبب توضیح بهتر کاهش نرخ تجزیه پذیری در واحد زمانی می باشد:

معادله ۴-۷: $dDt / dt = e \times (Dp-Dt)$

در معادله ۴-۷، Dp بخش بالقوه قابل تجزیه مواد مغذی می باشد. Dp همانند یک شاخص برای نرخ قابلیت تجزیه پذیری مواد غذایی که نسبتی از مقدار قابلیت تجزیه پذیری مواد باقیمانده در واحد زمان می باشد، عمل می کند. این نوع بررسی می تواند پذیرش n مرتبه اجزای وابسته به نرخ تجزیه

پذیری نسبی مواد (ci) و نرخ تجزیه پذیری بالقوه مواد (Dpi) را عملی نماید. در این حالت اگر ارزش ci بالا رود تحت شرایط خاص می تواند Dpi پنداشته شود. با توجه به اهمیت تجزیه پذیری مواد مغذی، تنوع معادلات به دلیل شرایط متفاوت کاری محققین بالا می باشد. اما همه آنها براساس اصل مواد مغذی ناپدید شده از کل مواد مغذی مصرفی در طی تخمیر و مدت زمان این فرآیند پیروی می کنند. علاوه بر اهمیت تجزیه پذیری مواد مغذی در هنگام الگونویسی کارشناسان به تجزیه پذیری موثر هم که تابع نرخ عبور مواد غذایی و مدت زمان حضور مواد مغذی در شکمبه می باشد، توجه دارند. اما از طرف دیگر مدت زمان تخمیر هم که تحت تاثیر فاز تاخیری می باشد، اهمیت بسزایی در الگونویسی خواهد داشت.

فاز تاخیری که در آغاز پروسه تجزیه پذیری دیده می شود شامل مدت زمانی است که میکروارگانیسم ها به خوراک مهیا شده چسبیده تا روند تجزیه را آغاز کنند. در این زمینه هم دو الگو به نام فاز تاخیری مجزا (در مقابل هضم بخش به بخش) و پیشرفت فاز تاخیری طراحی که در جدول ۳-۷ ارائه شده است. اما نهایتا مدت زمان مورد نیاز فاز تاخیری وابسته به دو اصل سرعت انجام کار و مقاومت مواد مغذی در مقابل تجزیه میکروبی R(t) می باشد:

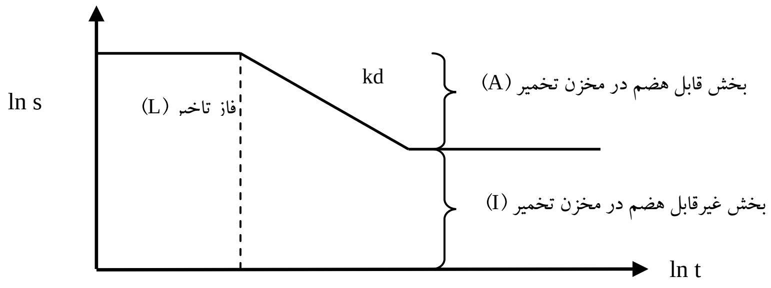
معادله ۵-۷: $dD_t / dt = R(t) \times D_t$

این مقاومت اثر منفی بر نمودار توزیع نمایی رشد خواهد داشت. اما در صورت کاهش R(t) معادله ۴-۵ مطابق تغییرات توزیع نمایی به شکل ذیل ($R(t)= a \times e^{-bt}$) تغییر خواهد کرد:

معادله ۶-۷: $dD_t / dt = (a \times e^{-bt}) \times D_t$

فاز تاخیر وقتی اهمیت خود را در الگونویسی تجزیه پذیری مواد مغذی از خود نشان می دهد که نرخ عبور مواد جامد سریع (بین ۸ تا ۱۰ درصد) و میانگین توقف مواد در شکمبه (بین ۸ تا ۱۶ ساعت) کم باشد. در این حالت افزایش فاز تاخیر سبب از دست رفتن بخشی از مواد غذایی در شکمبه می شود (شکل ۱-۷). میزان مواد مغذی باقیمانده در مدفوع می تواند شاخص مناسبی برای تعیین میزان قابلیت هضم مواد مغذی و تاثیر فاز تاخیر در این روند باشد که در معادله ۷-۷ ارائه شده است. در نهایت می توان گفت که فاز تاخیری برای هر خوراک وابسته به قدرت آبگیری ماده غذایی، جمعیت میکروارگانیسمی، محدود کننده های فیزیکی و شیمیایی هضم، ترکیب جیره مصرفی و قدرت حمله همه جانبه میکروب ها و آنزیم ها دارد. قدرت آبگیری مواد غذایی از دسته موارد مهم در الگونویسی تجزیه پذیری مواد غذایی محسوب می شود که به شکل مخفی در سیر تجزیه حضور دارد.

معادله ۷-۷: مقدار مواد باقیمانده ازتجزیه پذیری $= A \times e^{-kd(t-L)} + I$



شکل ۱-۷ دیاگرام مواد مغذی باقیمانده در مدفوع بر اثر افزایش فاز تاخیر. غلظت مواد مغذی (s) و زمان (t) نامگذاری شده است. افزایش فاز تاخیر سبب کاهش مدت زمان تجزیه مواد مغذی و نهایتا سبب افزایش آن مواد در مدفوع می شود.

۲-۲-۷ فعالیت های میکروبی

از آنجا که فعالیت های تخمیری شکمبه به شدت وابسته به میکروارگانیسم ها، تعادلات بین آنها و پراکنش گونه ای میکروبی دارد لذا قرار دادن فاکتور فعالیت های میکروبی در الگونویسی سبب تفهیم بهتر فعالیت های تجزیه پذیری مواد مغذی و پیش بینی نزدیک تر تولیدات آنها می شود. بیشترین الگوهای بکار رفته در این زمینه الگوهای تناوبی می باشد که بصورت تعدادی متغیر ثابت X_{q} (مانند توده میکروبی، کمیت و کیفیت مواد مغذی، کارآیی مواد مغذی و سنتز پروتئین میکروبی) ارائه و تغییرات این متغیرها در واحد زمان توسط معادلات دیفرانسیلی معرفی می شوند (معادله ۸-۷).

معادله ۸-۷: $\mathrm{dX}_i / \mathrm{dt} = f_i\,(X_1,X_2,\ldots,X_{\mathrm{q}} : P)\!: i = 1,2,\ldots,\mathrm{q}.$

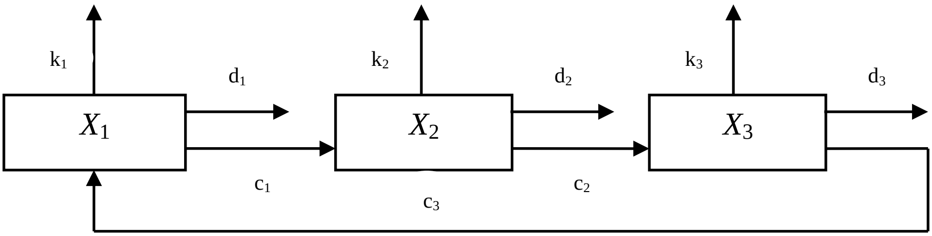
در این معادله P محل قرار گیری انواع فاکتورهای ثابت بوده و f_i نرخ تغییر متغیرهای ثابت می باشد که می تواند نرخ های مختلف اجزای متغیرهای ثابت را در شرایط متفاوت مقایسه نماید.کارشناسان سه نوع راهبرد متفاوت در الگوهای تناوبی جهت فعالیت های میکروبی تجزیه پذیری شناسایی کرده اند که به نوع الگوی دینامیکی ارائه شده در اکوسیستم میکروبی شکمبه مربوط می شود. راهبرد نوع اول؛ زمانی بارز می گردد که روند طراحی در حالت ایستادگی پایدار قرار داشته باشد و معادلات دیفرانسیل آن با قرار گرفتن در حالت صفر حل شود. بطور مثال؛ راهبرد اول را می توان بصورت غیرمستقیم در جهت تعیین فعالیت های فیبرولایتیک قارچ های بی هوازی و یا فعالیت های سلولایتیک باکتری ها بکار برد. این راهبرد می تواند در حین توضیح چرخه زندگی قارچ یا باکتری در هنگام پراکندگی بصورت آزاد به فعالیت های زیستی روی مواد غذایی، چگونگی تماس و سازگاری با شرایط محیطی هم بپردازد. راهبرد نوع دوم؛ زمانی آشکار می شود که روند طراحی فاقد حالت ایستادگی پایدار باشد و معادلات دیفرانسیل آن از طریق انتگرال گیری تحلیل شوند. کاربرد این راهبرد در تعیین رشد و تولیدات ناشی از

رشد در محیط های کشت می باشد. لذا این راهبرد در تعیین قابلیت هضم مواد غذایی در شکمبه و توضیح اثرات متقابل گروه های میکروارگانیسمی بر روی مواد مغذی اهمیت بالایی خواهد داشت. و راهبرد نوع سوم؛ زمانی مشاهده می شود که روند طراحی علاوه بر فقدان حالت ایستادگی پایدار، معادلات دیفرانسیل آن بصورت عددی حل گردد. بکارگیری این راهبرد جهت شبیه سازی الگوهایی که هضم مواد مغذی، تولیدات نهایی هضم و متابولیسم گروه های میکروبی را از شیوه انتگرال پیش بینی می کنند، موثر می باشد. بطور مثال؛ این راهبرد می تواند الگوی متابولیسم اسیدهای چرب فرار در شکمبه را ارائه و نحوه تولید، اثرات میکروبی آن و نرخ ناپدید شدن اسیدهای مزبور از شکمبه را کاملا تشریح نماید. لذا می توان گفت که راهبرد نوع سوم براساس اصول زیستی و قوانین ریاضی پایه گذاری شده است. اگر چه هر سه روش الگو فوق می تواند دارای یک مفهوم گسترده باشند، اما در جزئیات و ارائه راه حل های تفهیمی متفاوت می باشند. جزئیات می تواند از اثر عادت پذیری دام به خوراک مصرفی تا وسایل آزمایشگاهی جهت اندازه گیری را شامل شود. این جزئیات مانند اسیدیته، غلظت اسیدهای چرب فرار و آمونیاک، میزان فیبر، جذب، فرآوری های غذایی و غلظت مواد غذایی در خون دستگاه گوارش می توانند به طور مستقیم بر نوع الگوی توصیفی و هر یک بطور مجزا و یا ترکیبی بر فعالیت های میکروبی در حال الگونویسی اثر بگذارند.

در راهبرد نوع اول ابتدا فعالیت های زیستی میکروارگانیسم ها که جزء متغیرهای ثابت در شکمبه محسوب می شود، تقسیم بندی (X_n) و سپس مدت زمان لازم برای هر فاز بدست آمده را اندازه گیری می کنیم (λ_n). یک از مهمترین شرایط تقسیم بندی فعالیت های زیستی میکروبی در شکمبه ارتباط مداوم و یک طرفه بین فعالیت های زیستی یک میکروب می باشد. بطور مثال؛ تولید تخم جدید و بلوغ جنسی، آزادسازی تخم ها و جوانه زنی یا رویش هر تخم می تواند روند تقسیم شده فعالیت زیستی قارچ ها باشد (شکل ۲-۷). سپس براساس نوع میکروارگانیسم می توان یک بخش قابل حرکت در مایع شکمبه هم براساس نوع تقسیم بندی در نظر گرفت که در الگو لحاظ کنیم (Y_n).

از آنجا که براساس نوع وضعیت زیستی، میکروب ها می توانند به صورت آزاد و یا متصل به اجزای غذایی شکمبه را ترک کنند، لذا نرخ عبوری برای همه مراحل در نظر می گیریم (k_n). بعد از تعیین نرخ عبور می توان برای هر یک از مراحل موجود نرخ ثبات براساس مرگ و میر در نظر گرفت (d_n). حال براساس اصول کلی و با توجه به اطلاعات فوق و شکل ۲-۷ یک معادله دیفرانسیل جهت تجزیه پذیری طراحی و اصول دینامیکی شکمبه را با آن بیان نمود:

معادله ۹-۷: $$dX_n / dt = \lambda_n^{-1}\, Y_n X_n - (k_n + d_n + \lambda_n^{-1})\, X_n$$



شکل ۲-۷ بخش بندی های شماتیکی جهت ارزیابی جمعیت میکروبی در شکمبه براساس راهبرد نوع اول.

الگوهای فیزیکی ارائه شده در راهبرد دوم اغلب جهت متابولیسم میکروبی و اثرات متقابل فعالیت می کنند. این الگوهای ریاضی بخوبی پارامترهای حیاتی در رشد میکروبی و متابولیسم آنها را توضیح می دهند. بیشتر الگوهای فیزیکی ارائه شده در این راهبرد شامل کشت میکروبی در شرایط متعادل رشد می باشد. یک رشد متعادل زمانی حاصل می شود که گسترده شدن RNA ، DNA و تعداد سلول ها میکروبی در واحد زمان یکسان باشد. در هنگام شبیه سازی الگوهای فیزیکی شکمبه باید به حالت باز (در این حالت اجزای تشکیل دهنده وارد و خارج می شوند) و یا بسته (در این حالت اجزای تشکیل دهنده مهم نمی تواند وارد و یا خارج شود) بودن شکمبه توجه نمود. بطور مثال؛ وقتی دام در حال مصرف خوراک است تا مدتی سیستم حالت باز و وقتی در حال استراحت است تا مدتی سیستم حالت بسته دارد. البته عده ای کثیری از کارشناسان بر این باورند که سیستم شکمبه نیمه بسته بوده و هرگز بسته نمی شود. آنها فعالیت های بزاق و دیواره شکمبه را سبب فرضیه نیمه بسته بودن شکمبه می دانند. با این وجود، حالت های متنوعی برای رشد توده زنده میکروبی در محیط های کشت دیده شده است که معادلات دیفرانسیلی رفتارهای دینامیکی را برای توده زنده $(X,\ g)$ و مواد مغذی $(S,\ g)$ در واحد زمان توضیح می دهد:

معادله ۱۰-۷:

$$dX / dt = 0,\ 0 \le t < L,$$
$$= \mu X,\ t \ge L,$$

معادله ۱۱-۷:

$$dS / dt = 0,\ 0 \le t < L,$$
$$= -\ qX,\ t \ge L,$$

μ = نرخ رشد خاص که معادل بیشترین نرخ رشد در محیط کشت است(در ساعت)

q = متابولیک خارج از کارآیی مواد مغذی (g S/g X per h)

L = تاخیر رشد (در ساعت)

حال اگر μ عدد ثابتی در نظر گرفته شود معادله ۱۰-۷ تحلیل انتگرالی ذیل را ارائه می دهد:

معادله ۱۲-۷:

$$X = X_0,\ 0 \le t < L,$$

$= X_0 e^{\mu(t-L)}, t \geq L,$

$X_0 =$ توده زنده اولیه

اما مهمترین مانع در مجموعه کشت های میکروبی و معادلات وابسته به آن، بسته بودن روند تخمیر بدون خروج مواد تولید شده از میکروب ها می باشد. بنابراین، اطلاعات و نمودارهای رشد با تعدادی مرحله (مرحله تاخیری، مرحله توزیع نمایی، مرحله ثابت یا پایدار و مرحله مرگ) نمی توانند اکوسیستمی مشابه با شکمبه را فراهم نمایند. همچنین، بقای یک گونه میکروبی در کشت مخلوط به فاکتورهای دیگری هم وابسته می باشد که شامل بازده رشد و نزدیکی یا پیوستگی به مواد مغذی است. بازده رشد (Y، گرم ماده زنده از هر گرم ماده غذایی) به طور معنی داری مقدار احتیاجات غذایی یک میکروب را بیان می کند:

معادله ۱۳-۷: $\mathrm{Y} = - \mathrm{d}X / \mathrm{d}S.$

بازده در معادلات بازده رشد پیشتر برای پیش بینی مقدار سنتز پروتئین میکروبی در هر واحد از ماده غذایی قابل تجزیه در شکمبه کاربرد دارد. انتگرال معادله بازده رشد براساس حداکثر توده زنده (X_{m}) و ارزش اولیه مواد مغذی (S_0) عبارتنداز:

معادله ۱۴-۷: $X_{\mathrm{m}} - X_0 = YS_0,$

بنابراین، از انتگرال گیری معادله بازده رشد می توان فهمید که نمودار حداکثر تراکم توده زنده در مقابل مقدار مواد مغذی اولیه یک خط مستقیم و با شیب ملایم می باشد. نرخ رشد در مجموعه کشت های میکروبی به طور واقعی تحت تاثیر غلظت مواد غذایی نمی باشد و تراکم بالایی از مواد غذایی باقیمانده در مرحله رشد توزیع نمایی آن دیده می شود. این در حالی است که در شرایط مزرعه ای و یا آزمایش مستقیم در شکمبه همواره غلظت مواد غذایی محلول جز در مرحله ابتدایی بعد از غذا خوردن پایین بوده و می تواند اثر بر روی فعالیت های میکروبی داشته باشد. البته این مسئله در حد یک فرضیه بوده و معادله نرخ رشد خاص (μ) با تنوع تراکم های غلظت مواد مغذی ($[S]$: g / l) چیز دیگری را نشان می دهد:

معادله ۱۵ -۷: $\mu = \mu_{\mathrm{m}} / (1 + \mathrm{k_s} / [S]),$

$\mu_{\mathrm{m}} =$ ارزش حداکثری نرخ رشد خاص که از $[S]$ بدست می آید (در ساعت)

$\mathrm{k_s} =$ پایداری در اشباع مواد مغذی (گرم در لیتر)

معادله ۱۵-۷ معروف به معادله مونود (Monod) در قرن بیستم بوسیله آزمایشات تجربی اثبات گردید. این معادله مشابه معادله میکائیلیس- منتون می باشد و فاکتور $\mathrm{k_s}$ موجود در معادله میزان

وابستگی ارگانیسم را به غلظت سوبسترا نشان می دهد، که برابر با محدودیت رشد غلظت مواد مغذی در میانه حداکثری نرخ رشد خاص است. لازم به ذکر است غلظت مواد مغذی موجود در شکمبه به میزان شسته شدن آنها وابسته می باشد، که این مسئله در راهبرد نوع سوم مشخص می گردد.

معادله مونود براساس فرضیه نیچه تغییر یافت. نیچه معتقد بود که میزان دسترسی مواد مغذی توسط میکروب ها تنها به نزدیکی میکروارگانیسم با مواد مغذی وابسته نمی باشد، بلکه سطح مواد مغذی جهت فعالیت تعداد بیشتر میکروارگانیسم ها هم از اهمیت بالایی برخوردار بوده و باید در معادلات تجزیه پذیری وارد گردد. در این حالت بجای S از S_r (میلیمتر مربع سطح از میلیگرم مواد مغذی جامد) و بجای k_s از k_{sr} (میلیمتر مربع سطح از میلیگرم مواد مغذی جامد) استفاده می شود. البته این تصحیح باید برای هر گونه میکروبی به صورت خاص اعمال گردد. زیرا بطور مثال؛ وقتی اندازه ذرات مانند کاه افزایش یابد، نرخ تولید گاز توسط باکتری ها کاهش اما برای قارچ ها بی اثر می باشد. نرخ تولید گاز می تواند بیان گر نوعی از نرخ تجزیه پذیری مواد مغذی باشد.

اما اثر متقابل میکروارگانیسم ها هم همچون سطح تماس اثر برجسته ای در تجزیه پذیری مواد مغذی خواهد داشت. لذا براساس کنترل میزان رشد آنها می توان معادلات مربوط به اثر متقابل میکروارگانیسمی را در تجزیه پذیری لحاظ کرد. میکروب ها می توانند با تولیدات خود (P) و یا مصرف سریع تر مواد مغذی رشد سایر میکروب ها را متوقف کنند. بر همین اساس می توان معادله نرخ رشد خاص را از اثر متقابل میکروارگانیسم ها بدست آورد:

معادله ۱۶-۷: $\mu = \mu_m / (1 + (1 + [P] / J_P)\, k_s / [S]),$

P = تراکم محدود کننده تولید شده از گونه میکروبی (گرم در لیتر)

J_P = پایداری محدود کننده (گرم در لیتر)

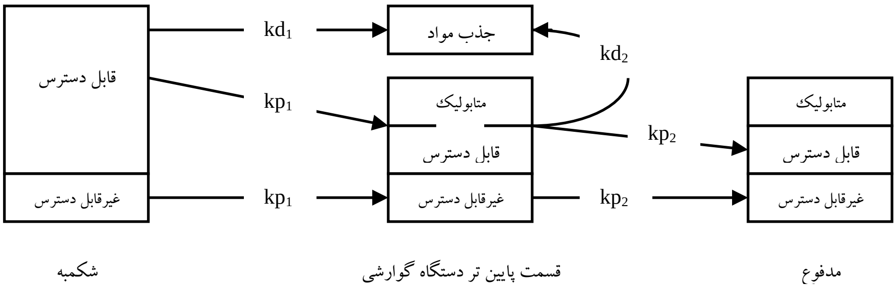
لازم به ذکر است تنها تولیدات میکروبی عامل کنترل جمعیت میکروبی نمی باشد. بطور مثال؛ باکتریوسین ها (پپتیدهای آنتی باکتریال)، اسیدهای چرب فرار، آمونیاک و اسیدیته ممکن است در تنظیم جمعیت باکتری ها و میزان فعالیت آنها نقش دینامیکی داشته باشند.

الگوهای تناوبی ارائه شده براساس راهبرد سوم بیشتر جهت ارائه یک الگوی مناسب تخمیر تحت اثر خوراک مصرفی و تناوب این مصرف می باشد. این الگوها می توانند از شبیه سازی مسیرهای متابولیسمی مانند شکل ۴-۲ برگرفته شده باشند. برای این نوع شبیه سازی براساس نوع اسید چرب باید میکروارگانیسم ها را طبقه بندی و اثرات متقابل بین آنها را بررسی نمود.

۳-۲-۷ فعالیت های جنبشی ذرات

حیوانات گیاه خوار به خصوص نشخوارکنندگان جهت کسب انرژی بیشتر از خوراک مصرفی از استراتژی ماندگاری خوراک (Mean Retention Time) براساس اندازه ذرات استفاده می کنند. در این روش مواد مغذی قابل هضم براساس میزان فرار اجزای غذایی از شکمبه دسته بندی و بررسی می گردند. موضوع این بررسی به طور خلاصه شامل کنترل مکانیزم ماندگاری انتخابی مواد مغذی در شکمبه و تعیین فاکتورهای وابسته به فعالیت های جنبشی ذرات می باشد.

ماندگاری انتخابی ذرات غذایی در شکمبه توسط تکنیک های متفاوتی بررسی شده است. نرخ عبور مواد مغذی از شکمبه که توسط نشانگرها قابل بررسی و اندازه گیری می باشد، با اندازه ذرات و یا میزان ماندگار خوراک در شکمبه به طور معکوس ارتباط دارد ($MRT = 1 / k$). طول ذرات غذایی و وزن آنها از مهمترین فاکتورهای موثر بر نرخ عبور مواد مغذی از شکمبه است، که می تواند توسط فرآوری ها و نوع خوراک مصرفی تغییر یابد. افزایش طول ذرات و یا کاهش وزن مخصوص سبب کاهش نرخ عبور و بالطبع سبب افزایش ماندگاری مواد غذایی و تجزیه پذیری بیشتر آنها در شکمبه می شود. طول ذرات غذایی با وزن مخصوص هر ذره یک رابطه تنگاتنگ و معکوس داشته و افزایش وزن مخصوص مواد مغذی در شکمبه ناشی از کوچکتر شدن طول ذرات غذایی توسط خرد شدن بیشتر آنها می باشد. کارشناسان یکی از عوامل کنترلی اندازه و یا وزن مخصوص ذرات را شناسایی دقیق میزان و نوع جویدن دام در نظر می گیرند. جویدن سبب شکسته شدن عناصر غذایی و بهبود تجزیه پذیری بهتر میکروب ها خواهد شد. اما با بکارگیری این روش در جهت شناسایی فعالیت جنبشی ذرات میزان دقت اندازه گیری تاثیر ذرات بر قابلیت تجزیه پذیری مواد مغذی کاسته خواهد شد. علت این موضوع فرار دسته ایی از عناصر غذایی از بخش نشخوار و یا جویدن مجدد در حین خوردن می باشد. از طرف دیگر، گروهی از محققین به دلیل ارتباط میزان گاز تولیدی با اندازه ذرات، بررسی آن را جهت تعیین تاثیر طول ذرات بر فعالیت های تجزیه پذیری مهم تر می دانند. آنها معتقدند که با افزایش مدت زمان ماندگاری غذا که ارتباط مستقیم با طول ذرات غذایی دارد، سبب کاهش حباب های گاز به دام افتاده ناشی از خردتر شدن ذرات غذایی می شود. اما مشکل اصلی این فرضیه زمانی آشکار می شود که بدانیم اندازه ذرات غذایی به دلیل افزایش ماندگاری خوراک بطور پیوسته در حال کاهش بوده و تفسیر این مکانیسم با طول ذرات بسیار سخت می باشد. لذا بهترین راه حل برای بررسی میزان اثر اندازه ذرات غذایی بر تجزیه پذیری مواد مغذی، استفاده از نرخ عبور مواد به کمک نشانگرها است (معادله ۱۷-۷ و ۱۸-۷). با فرضیه نرخ عبور می توان کلیه فعالیت های مواد مغذی را در شکمبه رهگیری و الگونویسی نمود (شکل ۳-۷).



شکل ۳-۷ تاثیر نرخ هضم و عبور بر نرخ هضم مواد مغذی. نرخ هضم (kd) و نرخ عبور (kp) می باشد.

براساس این الگو می توان گفت که کلیه ذرات مغذی وقتی وارد دستگاه گوارش می شود که فعالیت جنبشی آنها را به دو سمت جذب توسط تخمیر و عبور از مخازن دستگاه گوارش سوق می دهد.

معادله ۱۷-۷: درصد نرخ هضم مواد مغذی در شکمبه = $kd_1 / (kp_1 + kd_1)$

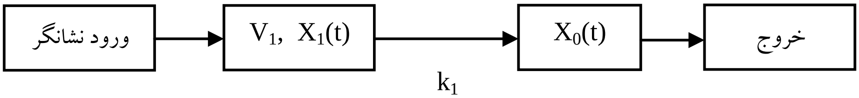
معادله ۱۸-۷: درصد نرخ عبور مواد مغذی از شکمبه = $kp_1 / (kp_1 + kd_1)$

نشانگرها می توانند برای مایعات (Co-EDTA) و یا جامدات (Cr-EDTA) استفاده شوند. علت انتخاب فرضیه نرخ عبور در جهت تجزیه پذیری و فعالیت های جنبشی ذرات در شکمبه ارتباط آن با زمان ماندگاری مواد مغذی می باشد. لازم به یادآوری است که ذراتی اجازه عبور از شکمبه را پیدا می کنند که اصلا تجزیه نشده اند و یا زمان کافی برای تجزیه را نداشتند. لذا، با گسترش فرضیه نرخ عبور و زمان ماندگاری سبب می گردد که مفاهیم ارزشیابی مواد مغذی و نرخ تجزیه پذیری آنها توسط مفاهیم دینامیکی تغییر و به صورت پویا تر بررسی گردد. اما هر چقدر مکانیسم های ماندگاری انتخابی ذرات غذایی بیانگر فرآیندهای تجزیه پذیری باشند، فاکتورها و مراحل ماندگاری انتخابی می بایست براساس معادلات تناوبی دینامیکی شکمبه میزان قابلیت هضم مواد مغذی را پیش بینی نمایند. با این ترتیب زمان ماندگاری مواد مغذی در شکمبه که بیانگر تاثیر فعالیت های جنبشی ذرات بر تجزیه پذیری آنها می باشد، توسط تکنیک های نشانگر و یا کنترل تخلیه شکمبه ارزیابی می شوند. تفسیر نرخ تجزیه پذیری مواد مغذی از طریق نشانگرها توسط تعیین نرخ ثابت خروجی مواد مغذی (یعنی ورود و خروج ثابت یا پایدار مواد از یک بخش تخمیری) آغاز می گردد. این اندازه گیری به جایگاه تخمیر و نوع الگوی بکار رفته در پیش بینی تجزیه پذیری وابسته می باشد. جایگاه تخمیر می تواند براساس نرخ ثابت ورود و خروج مواد مغذی (k) یا براساس محل قرار گیری خوراک در مدت زمان معین تقسیم شده باشد. اما ثابت بودن نرخ ورود و خروج کیسه تخمیری مهمترین عامل طبقه بندی جایگاه های تخمیر در نشخوارکنندگان است، که آن را Pool یا مخزن تخمیر می نامند. مخزن تخمیر دارای محیطی یکنواخت

و ورودی و خروجی های کنترل شده توسط اسفنگترها می باشد. بر اساس این تعریف نمی توان سکوم را که دارای نرخ ثابت ورودی مواد مغذی بوده، ولی مواد یکباره از آن تخلیه می شود، را یک مخزن تخمیر نامید. لذا، بعضی محققین مانند الیس جایگاه تخمیر را براساس مخزن تخمیر یک بخش (شکمبه) دانسته و عده ای آن را دو بخش (شکمبه و سکوم) در نظر می گیرند. الگوهای ارائه شده در زمینه فعالیت های جنبشی ذرات براساس همین تقسیم بندی به دو بخش تک مخزنی و دو مخزنی انجام گرفته است. البته جایگاه تخمیر فارغ از مخزن تخمیر می تواند به چهار یا شش بخش (شکمبه، هزارلا، شیردان، روده کوچک، روده بزرگ و سکوم) تقسیم شود. مخزن تخمیر می تواند به دو بخش مخزن جامد و مخزن مایع تقسیم گردد. بخش جامد به دو زیر گروه قابل عبور و غیر قابل عبور و بخش مایع به دو زیر گروه مایع متصل به ذرات غذایی و آب آزاد (عامل شناوری ذرات غذایی در شکمبه) طبقه بندی می شود.

۷-۲-۳-۱ الگوی فعالیت جنبشی ذرات براساس الگوی تک مخزنی

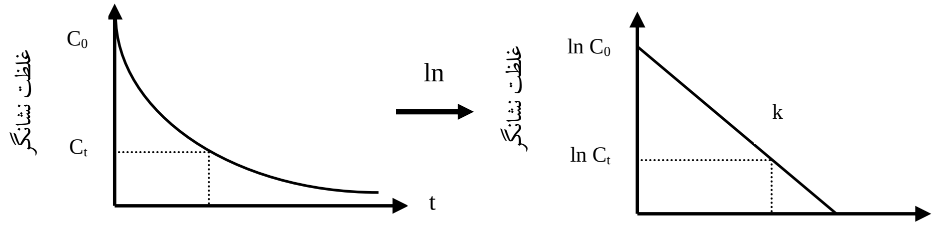
جهت الگونویسی فعالیت های جنبشی ذرات لازم است ابتدا مبانی فکری الگو ارائه و سپس راهبرد آن مشخص گردد. اصول طراحی الگوهای تک مخزنی به صورت ورود و خروج نشانگر از یک مخزن در واحد زمان بررسی می گردد (شکل ۴-۷).



شکل ٤-۷ اصول کلی طراحی الگوی تک مخزنی.

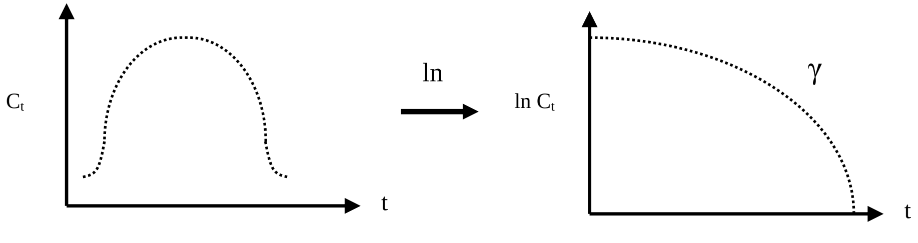
در الگوی ارائه شده (شکل ۴-۷)، V_1 مخزن تخمیر است که می تواند مواد تخمیری آن حالت مایع، جامد و یا آمیخته ایی از آنها باشد. در این حالت $X_1(t)$ مقدار باقیمانده نشانگر در مخزن تخمیر و $X_0(t)$ مقدار نشانگر خارج شده از مخزن در واحد زمان می باشد. k_1 هم میزان نرخ عبور نشانگر را از مخزن تخمیر مانند شکمبه نشان می دهد. نمودار توزیع نمایی ارائه شده برای الگوی تک مخزنی به صورت کاهنده می باشد (شکل ۵-۷). در این حالت C_0 برابر با غلظت نشانگر در زمان صفر ($Dose / V_1$) و C_t برابر با غلظت نشانگر در زمان t است ($X_0(t) / V_1$). اگر تغییرات توزیع نمایی (نمودار نزولی کاهنده) نشانگرها را به صورت لگاریتمی رسم نماییم، منحنی مزبور تبدیل به خط مستقیم می گردد. حال براساس فرضیات مسلم می توان معادله ذیل را ارائه نمود:

معادله ۱۹ -۷: $C_t = C_0 \times e^{-kt}$



شکل ۵-۷ نمودار توزیع نمایی و لگاریتمی غلظت نشانگر.

همچنین به کمک معادله فوق می توان ظرفیت شکمبه ($Dose / C_0$)، زمان ماندگاری ($1 / k$) و میزان خروجی نشانگرها ($V \times k$) را هم بدست آورد. علاوه بر الگوهای فوق کارشناسان به دلیل تاثیر زمان در فعالیت های جنبشی ذرات، الگوی وابسته به زمان را نیز ارائه نمودند (معادله ۲۰-۷). الگوهای وابسته به زمان براساس (۱) افزایش نرخ عبور ذرات غذایی به دلیل مصرف بیشتر ذرات غذایی در زمان های متوالی و (۲) تغییر خصوصیات ذرات غذایی (شناوری، تغییرات چگالی و خواص ریخت شناسی) تبیین و نمودارهای آن مانند Barbara Kasel وابسته به سطح خوراک مصرفی ترسیم گردید (شکل ۶-۷). لازم به یادآوری است هرگاه اثر سطح مصرف خوراک و نرخ عبور در واحد زمان در مسائل تجزیه پذیری بررسی گردید، رابطه این دو فاکتور با هم خطی بوده است. بدین معنی که هر چقدر سطح مصرف از ۵-۱ درصد افزایش یافت، نرخ عبور مواد جامد نیز از ۱۰-۲ درصد افزایش پیدا کرد. حداکثر نرخ عبور مواد جامد ۱۰-۸ درصد (هر ۱۲-۱۰ ساعت کل مواد جامد از شکمبه تخلیه و گروه بعدی جایگزین می شود) و مواد مایع ۱۶ درصد (هر ۸ ساعت کل مواد مایع از شکمبه تخلیه و مایعات بعدی وارد می شوند) می باشد.



شکل ٦-۷ نمودار بارباراکسل و لگاریتمی غلظت نشانگر (وابسته به زمان).

در صورتی که نمودار بارباراکسل به شکل لگاریتمی پیگیری شود، روند مذکور بصورت منحنی نزولی افزاینده تغییر خواهد کرد. حال براساس نمودارهای بدست آمده می توان معادله فعالیت جنبشی ذرات وابسته به زمان را بر پایه نشانگرها بیان کرد:

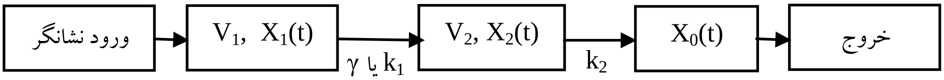
معادله ۲۰-۷:

$$C_t = D / V \times \gamma \times t \times e^{\gamma t / 0.59635}$$

به کمک معادله ۲۰-۷ و نمودارهای ارائه شده می توان ظرفیت شکمبه ($Dose / C_0$)، زمان ماندگاری (γ / 2) و میزان خروجی نشانگرها (γ 0.59635 × V) را براساس زمان و سطح مصرف بدست آورد.

۲-۳-۲-۷ الگوی فعالیت جنبشی ذرات براساس الگوی چند مخزنی (دو مخزنی شکمبه و سکوم)

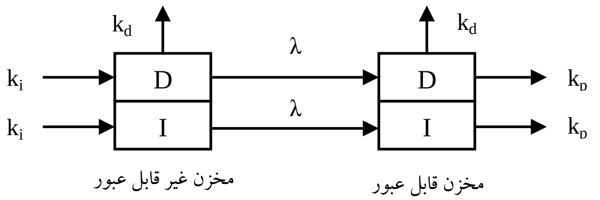
از آنجا که عده ای از محققین جایگاه تخمیر را دو مخزنی و گاه بیشتر در نظر می گیرند، می توان الگوی فعالیت های جنبشی ذرات را براساس مخازن تخمیر تغییر داد. برای این نوع الگونویسی می بایست تعداد مخازن تخمیر و فعالیت هر یک از آنها را بصورت کامل تشریح و بیان نمود. الگوی کلی ارائه شده در این حالت شامل:



شکل ۷-۷ اصول کلی طراحی الگوی دو مخزنی.

در الگوی مزبور $V_{1\ or\ 2}$ مخازن تخمیر هستند که می توانند مواد تخمیری آن حالت مایع، جامد و یا ترکیبی از آنها باشد. در این حالت $X_{1\ or\ 2}(t)$ مقدار باقیمانده نشانگر در مخازن تخمیر و $X_0(t)$ مقدار نشانگر خارج شده از مخزن در واحد زمان است. $k_{1\ or\ 2}$ هم میزان نرخ عبور نشانگر را از مخازن تخمیر مانند شکمبه و سکوم نشان می دهد. لازم به تذکر است که در بیان واژه تخمیر دو مخزنی یک تفاوت کلی در بین محققین دیده می شود. عده ای از آنها معتقدند که شکمبه و سکوم دو مخزن اصلی تخمیر به طور مجزا فعالیت نموده و باید در معادلات وارد گردند. اما عده ای دیگر از کارشناسان وجود دو مخزن تخمیر را در یک بخش بنام شکمبه قبول نموده اند. بطور مثال؛ الیس و همکارانش معتقدند که شکمبه دارای دو مخزن تخمیری کوچک و بزرگ بوده که مخزن کوچک در درون مخزن بزرگ قرار گرفته است. آنها بر این باورند که تاخیر ایجاد شده در همگنی یکنواخت نشانگر در شکمبه را می توان مخزن کوچک در نظر گرفته و توسط معادلات وابسته به زمان آن را توجیه می کنند. البته روش های توجیهی دیگری در تفسیر دو مخزنی بودن شکمبه ارائه شده است که مربوط به نرخ عبور است. در این روش مخزن به دو بخش (۱) مخزن قابل عبور از شکمبه و (۲) مخزن غیر قابل عبور از شکمبه تقسیم شده است. سپس، زمان لازم برای تبدیل شدن ذرات از بخش غیرقابل عبور به قابل عبور را زمان تاخیر در نظر گرفته و در معادلات مزبور وارد می کنند. در این حالت الگوی دو مخزنی ارائه شده به صورت شکل ۸-۷ تغییر خواهد کرد. در تفسیر الگوهای دو یا چند مخزنی غالبا دو دیدگاه وجود دارد که براساس سرعت نرخ عبور تبیین می شود:

	نرخ آهسته	نرخ سریع
دیدگاه اول	نرخ عبور از شکمبه –نگاری در این حالت تابع نمودار توزیع نمایی است.	نرخ عبور از قسمت پایین تر دستگاه گوارش (بعد از شکمبه) در این حالت تابع نمودار توزیع نمایی است.
دیدگاه دوم	نرخ تبدیل ذرات بزرگتر به کوچکتر و یا آماده سازی آن تابع نمودار توزیع نمایی است.	نرخ آماده سازی ذرات غذایی جهت تغییرات تجزیه پذیری توزیع گاما می باشد.



شکل ۸-۷ اصول کلی طراحی الگوی دو مخزنی در بخش شکمبه. بخش قابل هضم (D)، بخش غیر قابل هضم (I)، نرخ مصرف مواد غذایی (k_i)، نرخ عبور (k_p)، نرخ هضم مواد مغذی (k_d) و نرخ انتقال (λ) می باشد.

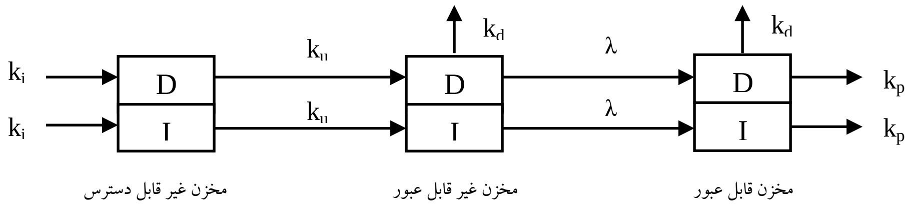
نرخ جذب مواد مغذی (k_d) را می توان از طریق فرمول های ذیل محاسبه نمود:

معادله ۲۱-۷: نرخ عبور در ساعت – نرخ مصرف در ساعت = نرخ جذب در ساعت

میزان انباشتگی مخزن تخمیری (کیلوگرم) / میزان مصرف (کیلوگرم در ساعت) = نرخ مصرف در ساعت

میزان انباشتگی مخزن تخمیری (کیلوگرم) / میزان عبور (کیلوگرم در ساعت) = نرخ عبور در ساعت

از آنجا که بعضی از ذرات غذایی ممکن است بوسیله مایعات بیشتر از تاثیر مرحله کوچکتر شدن ذرات غذایی از مخزن تخمیر عبور کنند، لازم است جهت تصحیح اثر آنها در بخش الگوی دو مخزنی مورد توجه قرار گیرند (شکل ۹-۷).



شکل ۹-۷ اصول کلی طراحی الگوی دو مخزنی با یک مخزن اضافه غیرقابل دسترس در بخش شکمبه. بخش قابل هضم (D)، بخش غیر قابل هضم (I)، نرخ مصرف مواد غذایی (k_i)، نرخ عبور (k_p)، نرخ هضم مواد مغذی (k_d) و نرخ انتقال ذرات غذایی (u و λ) می باشد.

این مقدار که شدیدا فعالیت جنبشی ذرات را تغییر داده و از روند نموداری توزیع نمایی تبعیت می کند، ممکن است بوسیله ارتباط k_p ذرات در مقابل k_p مایعات حاصل شود. همچنین این مقدار می تواند مشابه ارزش انتقال نشانگرها در فاز مایع نیز باشد. در الگوی ارائه شده فاز تاخیری که عامل اصلی انحراف از تجزیه پذیری مواد مغذی می باشد، فقط در بخش اول که k_d ندارد اتفاق می افتد. معادله بلاکستر و گرووم (معادله ۲۲-۷) نمونه ای از معادلات فعالیت جنبشی ذرات براساس مشاهدات نشانگرها در دو مخزن تخمیری (شکمبه و سکوم) کاملا مشخص می باشد (نمودار ۱۰-۷). اگر چه معادله مزبور بطور سطحی با بعضی نظریه ها مغایر است، اما در صورت پذیرش وجود دو مخزن در یک بخش مانند شکمبه این معادله می تواند باز هم کارآیی خود را ارائه دهد. یعنی می توان k_2 را برای سکوم صحیح ندانسته و آن را زمان لازم برای مخلوط شدن نشانگر در مخزن تخمیری شکمبه بیان نمود. اما با همه این تفاسیر زمان ماندگاری خوراک بین دو بخش موجود در مخزن تخمیر شکمبه هنوز مبهم باقی مانده است.

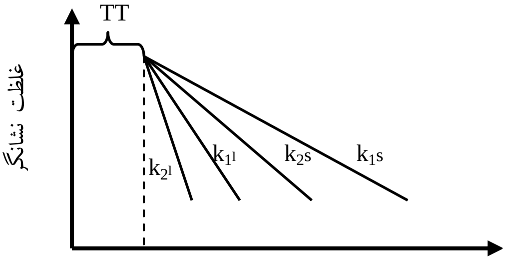
معادله ۲۲-۷: $$Y = Y_o \times (k_1 / k_2 - k_1) \times (e^{-k_1(t-TT)} - e^{-k_2(t-TT)}),$$

t = از لحظه مایه کوبی تا آخرین زمان تخلیه نشانگر

Y = غلظت نشانگر در مدفوع

TT = از لحظه مایه کوبی تا اولین حضور نشانگر در مدفوع

Y_o = غلظت نشانگر در کل مخزن تخمیر



شکل ۱۰-۷ نمودار معادله بلاکستر و گرووم؛ هر چقدر شیب نمودار تندتر شود زمان کمتری برای نرخ عبور صرف می گردد. فاز مایع (l) و فاز جامد (s) در نظر گرفته شده است.

یاد آور می شویم که نشانگرها علاوه بر تعیین نرخ عبور و زمان ماندگاری می توانند در محاسبه نرخ شکسته شدن ذرات مثمر ثمر واقع شوند. از طریق نرخ شکسته شدن ذرات و با کمک بارگذاری ذرات غذایی و میزان ناپدید شدن آنها در شکمبه می توان فعالیت های جنبشی ذرات را نیز تعیین نمود. در تعیین نرخ خرد شدن ذرات می توان از معادله ۲۲-۷ استفاده نمود:

معادله ۲۳-۷: میزان بارگذاری ذرات غذایی (گرم) / (ورودی ذرات غذایی – خروجی ذرات غذایی (گرم در ساعت))

برای صحت بیشتر معادله ۲۳-۷ لازم است که اطلاعات تخلیه شکمبه و تجزیه پذیری عناصر غذایی کاملا در دسترس باشد. نرخ خرد شدن ذرات غذایی می تواند بوسیله تفاوت زمان ماندگاری کل دستگاه گوارش از شکمبه ما بین ذرات بزرگتر نشان دار شده و ذرات غذایی موجود در مدفوع محاسبه شود.

۳-۳-۲-۷ اثر فعالیت های جنبشی ذرات بر رشد میکروارگانیسم ها

همانطور که در مباحث پیشین اشاره شد، کارآیی رشد میکروارگانیسم ها با کارآیی انرژی (Y_{ATP}) مترادف می باشد. لذا در جهت بررسی اثر فعالیت های جنبشی ذرات بر روی میکروب ها می توان به تغییرات کارآیی انرژی اشاره و آن را به رشد میکروارگانیسم ها تعمیم داد. زیرا طبق تعریف کارآیی رشد میکروبی عبارتست از گرم سلول میکروبی خشک شده از هر مول ATP می باشد. و از آنجا که طبق نظریه های اعلام شده بهترین کارآیی رشد گونه های میکروبی در محدوده ۲۶ الی ۳۲ کالری انرژی می باشد، پس باید بررسی نمود که میزان کارآیی انرژی در شکمبه با تغییر فاکتورهای موثر بر فعالیت جنبشی ذرات در چه محدوده ای قرار می گیرد. در واقع گزارشات نشان می دهد که کارآیی انرژی به طور متوسط در شکمبه ۱۰/۵ بوده و دارای محدوده ۴/۶ الی ۲۰/۹ می باشد. این عامل می تواند دلیل اصلی برای محدود کردن رشد میکروب ها در شکمبه منظور شده و بجای گسترش جمعیت میکروبی انرژی تولیدی بیشتر صرف نگهداری میکروارگانیسم ها گردد. حال اگر بتوان با کمک فاکتورهای موثر بر فعالیت جنبشی ذرات میزان کارآیی انرژی را افزایش داد می توان بصورت مستقیم جمعیت میکروبی را گسترش و دستخوش تغییر کرد (جدول ۴-۷). هر چقدر میزان انرژی تولیدی در شکمبه صرف نگهداری میکروارگانیسم ها شود، به همان میزان کارآیی انرژی جهت تولید توده میکروبی کمتر می شود.

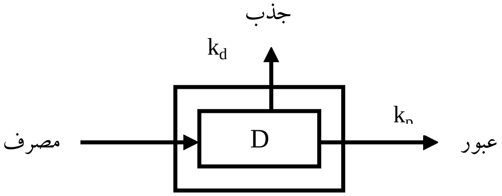
جدول ۴-۷ اثر رقت سازی بر کارآیی انرژی در شکمبه.

ردیف	نرخ رقت	کارآیی انرژی	نسبت ATP مصرفی برای نگهداری میکروارگانیسم ها
۱	۰/۰۲	۰۸/۵۰	۰/۶۵
۲	۰/۰۶	۱۳/۶۰	۰/۳۸
۳	۰/۱۲	۲۰/۳۰	۰/۲۴

۳-۷ الگونویسی هضم فیبر

به جرائت می توان گفت که اکثر ترکیبات غیر فیبری در دستگاه گوارش هضم و تخمیر می شوند. اما از آنجا که فیبر تقریبا خوراک اصلی گیاه خواران و بخصوص نشخوارکنندگان بوده و هضم آن بدون حضور میکروب ها امکان پذیر نمی باشد، توجه در زمینه هضم و تخمیر آن می تواند کلید اصلی

حذف بسیاری از مشکلات تغذیه ای باشد. تخمیر فیبر در یک اکوسیستم بسیار پیچیده ای صورت می گیرد که تحت اثرات متقابل پویا بین جمعیت میکروبی، کمیت و کیفیت فیبر مصرفی و دام میزبان قرار دارد. بررسی درباره هضم فیبر توسط میکروب های شکمبه بدلیل اثر آن بر سایر مواد مغذی قابل هضم از اهمیت بالای برخوردار می باشد. در این زمینه می توان از الگوهای ساده ریاضی جهت بررسی هضم فیبر در شکمبه و فاکتورهای موثر بر آن استفاده نمود. لازم به تذکر است که در الگونویسی هضم فیبر دو فاکتور قابلیت هضم فیبر و میزان مصرف از اهمیت زیادی برخوردار است که در عین ارتباط دارای استقلال خاصی هستند. بطور خلاصه قابلیت هضم فیبر تابع میزان جذب (k_d) و نرخ عبور (k_p) مواد مغذی در دستگاه گوارش دارد. ساده ترین الگوی ارائه شده جهت هضم فیبر به شرح ذیل می باشد:



شکل ۱۱-۷ الگوی هضم فیبر؛ قابلیت بالقوه هضم فیبر (D)، نرخ جذب (k_d) و نرخ عبور (k_p) در نظر گرفته شده است.

در تعیین قابلیت بالقوه هضم از معادله ۲۸-۷ استفاده می گردد، اما جهت اثبات این معادله ورود مواد مغذی و اندازه مخزن تخمیر ثابت فرض می شود:

معادله ۲۴-۷: $d_{Absorbed} / dt = k_d D$

معادله ۲۵-۷: $dD / dt = (d_{Intake} / dt) - (k_d + k_p) \times D$

وقتی که مخزن در حالت ثابت و پایدار (*Steady state*) قرار گیرد ($dD / dt = 0$)، معادله ۲۵-۷ به شکل ذیل تغییر می نماید:

معادله ۲۶-۷: $D = (d_{Intake} / dt) / (k_d + k_p)$

حال براساس جابجایی در معادله ۲۴-۷ و ۲۶-۷ معادله ذیل را طراحی می کنیم:

معادله ۲۷-۷: $d_{Absorbed} / dt = (d_{Intake} / dt) [k_d / (k_d + k_p)]$

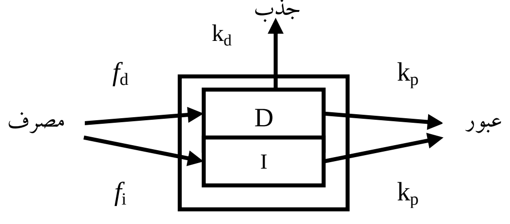
سپس طبق تعریف قابلیت هضم($(d_{Absorbed}/dt) / (d_{Intake}/dt)$) و معادله ۲۷-۷، می توان قابلیت بالقوه هضم را محاسبه کرد:

معادله ۲۸-۷: قابلیت بالقوه هضم $= k_d / (k_d + k_p)$

تاثیرات رقابتی مابین نرخ هضم و نرخ عبور در تجزیه پذیری مواد مغذی در معادله ۲۸-۷ کاملا مشهود است. بطور مثال؛ وقتی قابلیت بالقوه هضم از ۴۰ به ۸۶ درصد تغییر کند میزان k_p از ۰/۰۶ به ۰/۰۲ و میزان k_d از ۰/۰۴ به ۰/۱۲ در جهت عکس هم تغییر خواهد کرد. پس این معادله نشان می دهد که قابلیت هضم بصورت مستقیم تحت تاثیر نرخ هضم می باشد و هر فاکتوری این نرخ را تغییر دهد، قابلیت هضم دگرگون می شود. از آنجا که نرخ هضم فیبر بشدت وابسته به خاصیت فیزیکی – شیمیایی ساختمان فیبر دارد، لذا بر قابلیت هضم هم موثر خواهد بود. اما در معادله مزبور بصورت شفاف این فاکتور درج نشده است و آن را برای همه فیبرها ثابت در نظر گرفته اند، در حالیکه در گیاهان مختلف خواص ساختمانی متغیر می باشد. همچنین، در این معادله نشان داده شده است که با افزایش نرخ عبور قابلیت هضم کاهش می یابد. نرخ عبور بیانگر زمان ماندگاری خوراک در مخزن تخمیر می باشد. در این معادله نرخ عبور برای همه فیبرها ثابت در نظر گرفته شده است، در حالیکه این میزان براساس ساختار شیمیایی فیبر و سایر فاکتورها مانند سطح مصرف، اندازه ذرات غذایی و نرخ های آن، سلامت و ظرفیت مخزن بشدت متغیر می باشد.

۱-۳-۷ الگوی حداقلی هضم فیبر

در این الگو فیبر در برابر تجزیه میکروب ها از خود مقاومت نشان می دهد. در الگوی اولیه هضم فیبر، فیبر غیر قابل هضم (I) صفر در نظر گرفته شده است. این در حالی است که در مخزن تخمیر تمام شرایط ثابت نبوده و می تواند نرخ ناپدید شدن ذرات غذایی بصورت واقعی قابل تفسیر نباشد. به همین دلیل کارشناسان الگوی حداقلی هضم فیبر را ارائه نمودند (شکل ۱۲-۷).



شکل ۱۲-۷ الگوی حداقلی هضم فیبر در شکمبه؛ قابلیت بالقوه هضم فیبر (D)، بخش غیر قابل هضم (I)، نرخ جذب (k_d)، نرخ عبور (k_p)، فیبر مصرفی قابل هضم (f_d) و فیبر مصرفی غیر قابل هضم (f_i) در نظر گرفته شده است.

در تعیین قابلیت بالقوه هضم فیبر در الگوی حداقلی هضم از معادله ۳۳-۷ استفاده می شود که در استخراج این معادله شرط ثابت ماندن ورود مواد مغذی و اندازه مخزن تخمیر فرض می گردد:

معادله ۲۹-۷: $$d_{Absorbed} / dt = k_d D$$

معادله ۳۰-۷: $$dD / dt = f_d\,(d_{Intake} / dt) - (k_d + k_p) \times D$$

وقتی که مخزن در حالت ثابت قرار گیرد ($dD / dt = 0$)، معادله ۳۰-۷ به شکل ذیل تغییر می نماید:

معادله ۳۱-۷: $D = f_d (d_{Intake} / dt) / (k_d + k_p)$

حال براساس جابجایی در معادله ۲۹-۷ و ۳۱-۷ معادله ذیل را طراحی می کنیم:

معادله ۳۲-۷: $d_{Absorbed} / dt = (d_{Intake} / dt) (f_d) [k_d / (k_d + k_p)]$

سپس طبق تعریف قابلیت هضم و معادله ۳۲-۷، می توان قابلیت بالقوه هضم را محاسبه کرد:

معادله ۳۳-۷: قابلیت بالقوه هضم $= f_d [k_d / (k_d + k_p)]$

باید در نظر داشت که کل فیبر قابل هضم (بطور بالقوه) نمی تواند به نرخ هضم فیبر و نرخ ناپدید شدن ($k_d + k_p$) متکی باشد، بلکه بخش مصرفی فیبر قابل هضم هم در میزان آن موثر بوده است. در این الگو می توان فیبر غیر قابل هضم را هم بررسی کرد:

معادله ۳۴-۷: $dI / dt = f_i (d_{Intake} / dt) – k_pI$

وقتی که مخزن در حالت ثابت قرار گیرد ($dD / dt = 0$):

معادله ۳۵-۷: $I = [f_i (d_{Intake} / dt)] / k_p$

حال براساس جابجایی در معادله ۳۱-۷ و ۳۵-۷ معادله ذیل را طراحی می کنیم:

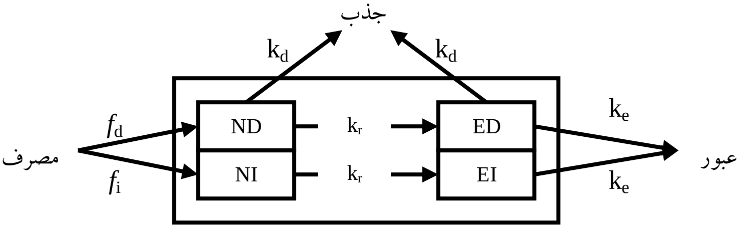
معادله ۳۶-۷: $(I / I + D) = (f_i / k_p) [(f_i /k_p) + f_d /(k_d + k_p)]$

معادله ۳۶-۷ نشان می دهد که فرضیه وابستگی کامل فیبر غیر قابل هضم به میزان مصرف باطل بوده و می تواند به بخش قابل هضم و غیر قابل هضم فیبر، نرخ عبور و نرخ جذب هم وابسته باشد. بخش غیر قابل هضم فیبر همانند بخش قابل هضم شدیدا تحت تاثیر خواص فیزیکی– شیمیایی و ساختار فیبر بوده وحضور لیگنین می تواند بخش غیر قابل هضم فیبر را نیز افزایش دهد.

۲-۳-۷ الگوی ماندگاری انتخابی

تمام خوراکی که وارد مخزن تخمیر (شکمبه) می شود، براساس اندازه ذرات غذایی توزیع می گردد. شکل توزیع براساس میزان خرد یا آردی بودن ذرات، خشک یا آبدار بودن مواد مغذی، خصوصیات شیمیایی و فعالیت های جوشی دام انجام می گیرد. ذرات غذایی براساس آستانه اندازه قابلیت عبور یا ماندگاری در مخزن تخمیر را پیدا می کنند. این آستانه اندازه براساس نوع دام متفاوت و در گوسفند ۱ تا ۲ میلیمتر و در گاو ۲ تا ۴ میلیمتر می باشد. اندازه ذرات و وزن مخصوص که با هم

ارتباط تنگاتنگ دارند، تعیین کننده میزان ماندگاری ذرات غذایی و عبور آنها از مخزن تخمیر می باشد. برای بررسی بهتر اثر دو فاکتور مذکور بر تجزیه پذیری فیبر الگوی ۱۳-۷ پیشنهاد شده است.



شکل ۱۳-۷ الگوی ماندگاری انتخابی هضم فیبر در شکمبه؛ قابلیت بالقوه هضم فیبر (D)، بخش غیر قابل هضم (I)، بخش قابل عبور (E)، بخش غیر قابل عبور (N)، نرخ جذب (k_d)، نرخ عبور (k_e)، نرخ انتقالی (k_r)، فیبر مصرفی قابل هضم (f_d) و فیبر مصرفی غیر قابل هضم (f_i) در نظر گرفته شده است.

در الگوی جدید، قابلیت بالقوه هضم فیبر از معادله ۴۳-۷ بدست می آید. برای استخراج این معادله ثابت بودن ظرفیت مخزن تخمیر و ورودی مواد مغذی از فرضیات محسوب می شود:

معادله ۳۷-۷: $$d_{Absorbed} / dt = k_d ND + k_d ED$$

معادله ۳۸-۷: $$dND / dt = f_d\ (d_{Intake} / dt) - (k_d + k_r) \times ND$$

معادله ۳۹-۷: $$dED / dt = k_r ND - (k_d + k_e) \times ED$$

وقتی که مخزن در حالت ثابت قرار گیرد ($dND / dt = dED / dt = 0$)، معادله ۳۸-۷ و ۳۹-۷ به شکل ذیل تغییر می نماید:

معادله ۴۰-۷: $$ND = [f_d\ (d_{Intake} / dt)] / (k_d + k_r)$$

معادله ۴۱-۷: $$ED = k_r ND / (k_d + k_e)$$

حال براساس معادلات فوق و معادله ۳۷-۷ می توان معادله ذیل را طراحی می کنیم:

معادله ۴۲-۷: $$d_{Absorbed} / dt = [k_d f_d (d_{Intake} /dt) / (k_d + k_r)] + [k_d k_r f_d (d_{Intake} /dt) / (k_d + k_r)(k_d + k_e)]$$

سپس طبق تعریف قابلیت هضم و معادله ۴۲-۷، می توان قابلیت بالقوه هضم را محاسبه کرد:

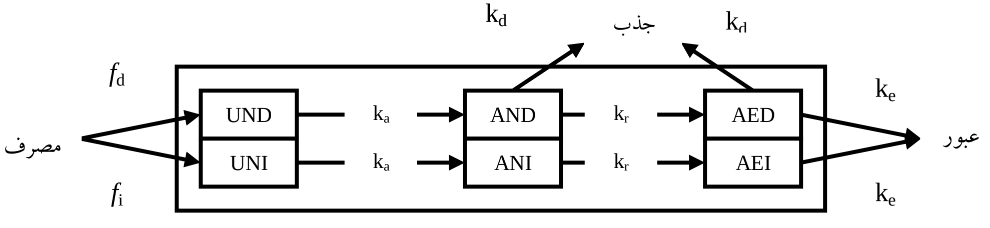
معادله ۴۳-۷: $$\text{قابلیت بالقوه هضم} = [f_d k_d / (k_d + k_r)][1+(k_r) / (k_d + k_e)]$$

حال می توان گفت قابلیت بالقوه هضم فیبر دارای دو مخزن دائمی تخمیر می باشد، که بر همین اساس میزان نرخ عبور (k_p) در الگوی حداقلی هضم فیبر به دو بخش نرخ انتقالی (k_r) و نرخ عبورمخزن (k_e) تقسیم می شود. نرخ انتقالی ذرات از حالت غیر قابل عبور به قابل عبور بشدت به دو نرخ تغییر

اندازه ذرات و وزن مخصوص وابسته می باشد. معادله ۴۲-۷ به صراحت نشان می دهد که نرخ انتقالی عامل بسیار موثری در هضم فیبر محسوب می شود و افزایش آن سبب بهبود قابلیت هضم فیبر دارد. اما این معادله نشان می دهد نرخ کوچکتر شدن ذرات غذایی با قابلیت هضم فیبر نسبت عکس دارد. بدین صورت که هر چقدر k_e به دلیل کوچکتر شدن اندازه ذرات و افزایش وزن مخصوص بیشتر شود، قابلیت هضم فیبر به جهت عبوری تر شدن مواد مغذی از شکمبه کمتر می شود. دیگر فاکتورهای موثر بر افزایش نرخ عبور ذرات فیبر آب مصرفی، تراوش بزاق، اسمولاریته محتویات شکمبه، انباشتگی توده غذایی و ظرفیت آب موجود در خوراک می باشد که می توانند بر ترن آور شکمبه موثر واقع شوند. هر عاملی که بتواند ذرات غذایی را به سمت ناحیه شکمی شکمبه انتقال دهد می تواند سبب عبوری تر شدن ذرات غذایی گردد.

۳-۳-۷ الگوی تاخیری هضم فیبر

از آنجا که پس از ورود مواد مغذی فیبری در شکمبه، میکروارگانیسم ها نمی توانند آنها را هضم کنند و نیاز است که مواد مغذی در ابتدا آبگیری نموده و شرایط هضم را مهیا نمایند، کارشناسان بر این باور شدند که الگوی تاخیری را جایگزین سایر الگوها نمایند (شکل ۱۴-۷). اگر فیبر مصرفی قبلا تخمیر جزئی داشته باشد و یا خیسانده شود، میزان تاخیر در تجزیه پذیری کمتر می شود اما از بین نمی رود. نرخ آبگیری ذرات غذایی می تواند فاز تاخیری را تحت تاثیر قرار داده و میزان آن را کاهش دهد. میزان نرخ آبگیری ذرات غذایی توسط حضور گروه های آب دوست بر سطح ذرات غذایی، کشش سطحی، تراکم مایعات، اندازه ذرات و ساختمان آنها تعیین می شود.



شکل ۱٤-۷ الگوی تاخیری هضم فیبر در شکمبه؛ قابلیت بالقوه هضم فیبر (D)، بخش غیر قابل هضم (I)، بخش تاخیری (U)، بخش قابل عبور (E)، بخش غیر قابل عبور (N)، نرخ قابل دسترس (k_a)، نرخ جذب (k_d)، نرخ عبور (k_e)، نرخ انتقالی (k_r)، فیبر مصرفی قابل هضم (f_d) و فیبر مصرفی غیر قابل هضم (f_i) در نظر گرفته شده است.

الگوی تاخیری قابلیت بالقوه هضم فیبر از معادله ۵۲-۷ بدست می آید، که از معادلات ذیل در حالت ثابت بودن ظرفیت مخزن تخمیر و ورودی مواد مغذی استخراج می شود:

معادله ۴۴-۷: $$d_{Absorbed} / dt = k_d AND + k_d AED$$

معادله ۴۵-۷: $dAND / dt = k_aUND - (k_d + k_r) \times AND$

معادله ۴۶-۷: $dAED / dt = k_rAND - (k_d + k_e) \times AED$

معادله ۴۷-۷: $dUND / dt = f_d (d_{Intake} / dt) - k_aUND$

مخزن در حالت ثابت باشد ($dAND / dt = dAED / dt = dUND / dt = 0$)، معادلات ۴۵ تا ۴۷ به شکل ذیل تغییر می کنند:

معادله ۴۸-۷: $AND = k_a UND / (k_d + k_r)$

معادله ۴۹-۷: $AED = k_rAND / (k_d + k_e)$

معادله ۵۰-۷: $UND = [f_d (d_{Intake} / dt)] / k_a$

حال براساس معادلات فوق و معادله ۴۴-۷ می توان معادله ذیل را طراحی می کنیم:

معادله ۵۱-۷: $d_{Absorbed} / dt = [k_d f_d(d_{Intake} /dt) / (k_d + k_r)]+[k_d k_r f_d(d_{Intake} /dt) / (k_d + k_r)(k_d + k_e)]$

سپس طبق تعریف قابلیت هضم و معادله ۵۱-۷، می توان قابلیت بالقوه هضم را در الگوی تاخیری محاسبه کرد:

معادله ۵۲-۷: قابلیت بالقوه هضم $= [f_d k_d / (k_d + k_r)][1+(k_r) / (k_d + k_e)]$

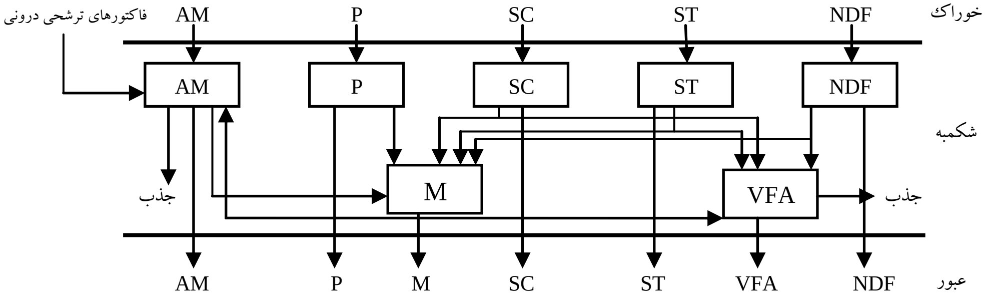
اگر چه در معادله نمی توان اثر تاخیر در هضم فیبر را بصورت مستقیم مشاهده کرد، اما بدلیل تاثیر غیرمستقیم فاز تاخیر بر روی زمان خیساندن فیبر در مخزن تخمیر جهت فعالیت تجزیه پذیری میکروبی و اثر آن بر نرخ عبور سبب شده است که کارشناسان فاز تاخیر را از گردونه الگونویسی خارج نکنند.

۴-۷ الگونویسی فعالیت های تخمیری اسیدهای چرب فرار

الگونویسی در باب تولید اسیدهای چرب فرار بخشی از بررسی های انجام شده درباره هضم خوراک، جذب مواد مغذی و کنترل مصرف می باشد. الگوهای ریاضی ارائه شده در این بخش گسترده هستند؛ اما الگوهای تناوبی Baldwin (BA)، Danfaer (DA) و Dijkstra (DI) بیشترین کاربرد را در این زمینه داشته است. اگر چه هر سه الگوی ارائه شده پیش بینی یکسانی از نرخ تجزیه پذیری، نرخ خروج مواد از شکمبه، پروتئین میکروبی و کل پروتئین خام دارند، اما اساسا در بیان مکانیسم های میکروبی موثر بر روندهای تولید اسیدهای چرب فرار متفاوت می باشند.

۱-۴-۷ شبیه سازی فاکتورهای موثر بر تخمیر اسیدهای چرب فرار

الگونویسی اسیدهای چرب فرار همواره با مشکلاتی روبرو بوده است. اولین مشکل، تخمیر میکروبی و اتفاقات گسترده آن است که در این روند بوجود می آید. عدم شناخت کافی از این رویکرد سبب شده است که کارشناسان انتقادات سختی درباره الگوهای پیش بینی اسیدهای چرب فرار داشته باشند. میکروارگانیسم ها در طی رشد و تولیدمثل مقداری از این اسیدهای چرب تولیدی را مصرف می نمایند که از دید بسیاری از الگوها دور مانده است. دومین مشکل، تولید مقداری از اسیدهای چرب فرار می باشد که در دیواره شکمبه شکل گرفته و از دید الگونویسان مخفی شده است. سومین مشکل الگونویسی اسیدهای چرب فرار فقدان تعمیم آن به همه خوراک های مصرفی می باشد. می دانیم که خواص فیزیکی– شیمیایی هر خوراک مخصوص بوده و می تواند شرایط تخمیری و تولیدی شکمبه را متاثر از خود نماید. طبقه بندی و وارد کردن همه فاکتورهای غذایی به الگوی اسیدهای چرب فرار امری مشکل و تقریبا غیرممکن بنظر می رسد. با این حال برای بررسی روند الگونویسی در این بخش فاکتورهای غذایی وارد شده در شکمبه را ثابت و شکمبه را یک بخش مجزا با مقدار اولیه اوره مورد نیاز فرض می نماییم. لذا براساس این فرض می توان یک الگوی کلی از نظریات مختلف ترسیم نمود (شکل ۱۵-۷). برای بررسی الگوهای ارائه شده علاوه بر سطح و ترکیب جیره مصرفی لازم است فاکتورهای خاصی را که قابل مشاهده می باشند، برای آنها در نظر گرفت.



شکل ۱۵-۷ الگوی ورود مواد مغذی در مسیر تولید اسیدهای چرب فرار؛ در این الگو آمونیاک (AM)، پروتئین (P)، کربوهیدرات محلول (SC)، نشاسته (ST)، فیبر محلول در شوینده خنثی (NDF)، توده میکروبی (MS) و اسیدهای چرب فرار (VFA) در نظر گرفته شده است.

حجم مایع شکمبه، قابلیت بالقوه هضم، بخش محلول جیره مصرفی، فیبر باقیمانده از شوینده خنثی، نشاسته، کربوهیدرات و پروتئین های محلول، نسبت چربی های اشباع و غیر اشباع مصرفی، اسیدیته شکمبه، نرخ عبور جامدات و مایعات می تواند از اینگونه فاکتورها محسوب گردند. البته ورودی های هر الگو همواره قابل مشاهده نیستند و گاه فاکتورهای ورودی در بعضی از الگوها (BA و DA) غیر

قابل مشاهده و یا در بعضی از الگوهای دیگر (DI) غیرقطعی می باشند. علاوه بر فاکتورهای ورودی می توان براساس الگوی ورود مواد مغذی بین الگوهای BA، DA و DI تفاوت قائل شد.

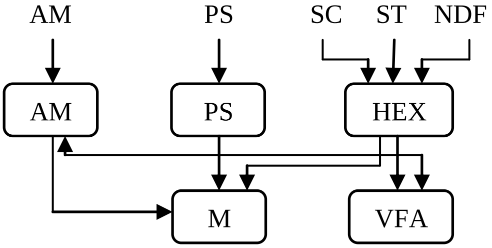
الگوهای ارائه شده درباره عوامل موثر بر تولید اسیدهای چرب فرار بیشتر شامل مکانیسم های شیمیایی و اثرات آن بر تولیدات تخمیری مانند نرخ عبور می باشد. در این الگوها سطح مصرف و تنظیمات آن کمتر مورد بحث قرار گرفته است. این الگوها می خواهند بیشتر اثرات متقابل خصوصیات فیزیکی- شیمیایی خوراک را با تولیدات تخمیری مورد بررسی قرار دهند. با وجود این، می توان تفاوت اصلی الگوهای ارائه شده را از طریق بررسی شبیه سازی مقدار مواد مغذی تبدیل شده به اسیدهای چرب فرار و غلظت هر اسید تولید شده مورد ارزیابی قرار داد. اگر چه صفاتی چون نرخ هضم، توده میکروبی، نرخ رشد میکروبی و موارد این دست جهت بررسی تفاوت های موجود در الگوها وجود دارند، اما بدلیل تاثیر بیشتر ماده مغذی بر تولید اسیدهای چرب فرار بکارگیری این فاکتور در شناخت تفاوت الگوها مناسب تر می باشد.

۷-۴-۱-۱ الگوی BA

الگوی BA علاوه بر خصوصیات شیمیایی به خصوصیات دینامیکی ذرات غذایی در تولید اسیدهای چرب فرار توجه می نماید. در این الگو فاکتورهای مهمی چون نرخ خرد شدن ذرات غذایی کوچک و بزرگ در شکمبه (Q_{lp} یا $k_{lp\ or\ sp}$ /d)، مقدار ذرات بزرگ و کوچک در شکمبه ($Q_{lp\ or\ sp}$, g) که توسط الکی با سوراخ تنظیم شونده ۱ تا ۲ میلیمتری بدست می آید و بخش ذرات کوچک وارد شده از طریق خوراک مصرفی(f_{sp}) وارد می گردد (شکل ۱۶-۷). لازم به ذکر است الگوی BA عنوان نموده است که فقط ذرات کوچکتر از دوازده عبور می کنند، در حالیکه آزمایشات نرخ عبور مواد جامد در شکمبه را هم اثبات کرده است (($k_{p,sol}$ (/d). لذا برای تصحیح این مقوله در شرایط پایدار $k_{p,sol}$ را با جمع نرخ اندازه کل مخزن ذرات و مخزن ذرات کوچک ضرب می کنند:

$$[k_{kp,sol} \times (Q_{lp} + Q_{sp}) / Q_{sp}]$$

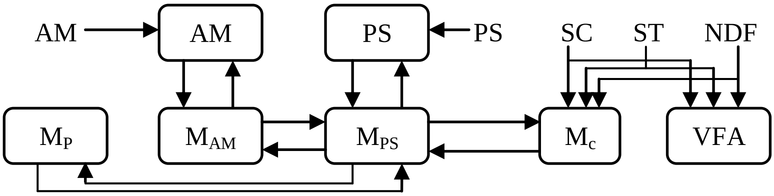
کنترل جریان خروجی NDF، P، SC و ST می تواند بررسی تخمیر و تجزیه پذیری را جهت تولید اسیدهای چرب فرار بهبود بخشد. افزایش خروجی فاکتورهای فوق سبب کاهش هضم مواد مغذی جیره شده و این کاهش سبب تغییر مقدار اسیدهای چرب فرار تولیدی می گردد. برای بیان اثرات متقابل فاکتورهای $k_{lp,sp}$ /d و f_{sp} در شبیه سازی فاکتورهای موثر بر تولید اسیدهای چرب فرار استفاده از فیبر محلول در شوینده خنثی بدلیل نسبت بالای آن در خوراک نشخوارکنندگان مناسب تر محسوب می شود.



شکل ۱٦-۷ الگوی BA موثر بر تولید اسیدهای چرب فرار؛ در این الگو آمونیاک (AM)، کربوهیدرات محلول (SC)، نشاسته (ST)، هگزوزهای محلول در شکمبه (HEX)، میکروارگانیسم ها (M)، فیبر محلول در شوینده خنثی (NDF)، پروتئین محلول (PS) و اسیدهای چرب فرار (VFA) در نظر گرفته شده است.

۷-۴-۱-۲ الگوی DA

الگوی DA برپایه الگوی BA طراحی شده است (شکل ۱۷-۷). در این الگو علاوه بر نرخ عبور مواد جامد و مایع، فاکتورهایی که بر نرخ عبور مواد مغذی اثر دارند وارد می شود. این فاکتورها می تواند محلولیت یا عدم محلولیت مواد مغذی مانند پروتئین یا نشاسته و همچنین توده میکروبی باشد. فاکتور محلولیت و عدم محلولیت مواد مغذی در الگوی DA براساس محوریت غلظت مواد مغذی در شکمبه (Q_s) و بخش عبوری آن از شکمبه ($k_{p,s}$) شکل گرفته است ($Q_s \times k_{p,s}$). لازم به ذکر است می توان بجای فاکتور $k_{p,s}$ از f_{liq} که بخش محلول مواد مغذی در جیره مصرفی می باشد، استفاده و فرمول ($Q_s \times [k_{p,liq} \times f_{liq} + k_{p,sol}\,(1- f_{liq})]$) را طراحی کرد. همچنین، در الگوی DA نرخ عبور توده میکروبی هم از طریق $k_{p,liq} / 2$ بدست می آید.



شکل ۱۷-۷ الگوی DA موثر بر تولید اسیدهای چرب فرار؛ در این الگو آمونیاک (AM)، کربوهیدرات محلول (SC)، نشاسته (ST)، آمونیاک میکروبی (M_{AM})، لیپید، نشاسته و دیواره سلولی میکروبی (M_c)، پروتئین آزاد میکروبی (M_{ps})، پروتئین های بزرگ میکروبی (M_p)، فیبر محلول در شوینده خنثی (NDF)، پروتئین محلول (PS) و اسیدهای چرب فرار (VFA) در نظر گرفته شده است.

دو فاکتور ($k_{p,s}$, f_{liq}) نشان می دهد که الگوی اسیدهای چرب فرار بشدت به نرخ عبور مواد مغذی حساس بوده و در همه الگوها به یک شکل محاسبه نمی شود. الگوی DA براساس فاکتورهای SC، ST و NDF می تواند معادله نرخ تخمیر کربوهیدرات را به اسیدهای چرب فرار (R_{tf}) ارائه دهد (معادله ۵۳-

۷). برای ارائه این معادله متغیرهایی مانند پروتئین میکروبی (Q_{mp} , mol of N)، غلظت ST ،SC و NDF قابل دسترس در شکمبه (Q_{sc} ،mol of C، Q_{st} و Q_{NDF}) ثابت در نظر گرفته می شود و پارامترهای a (g/d) و b (g) در معادله ۵۳ و c (بدون معیار و بین صفر و یک) در معادلات ۵۴، ۵۵ و ۵۶ جهت تفکیک نرخ تبدیل کربوهیدرات به اسیدهای چرب فرار جزء پارامترهای معادله میکائیلیس-منتون محسوب می گردند.

معادله ۷-۵۳: R_{tf} (mol C/D) = a×Q_{mp}×[(Q_{sc} +Q_{st} +Q_{NDF}) / (b +(Q_{sc} +Q_{st} +Q_{NDF}))]

معادلات تفکیک نرخ تبدیل کربوهیدرات به اسیدهای چرب فرار از طریق تخمیر:

معادله ۷-۵۴: تخمیر کربوهیدرات محلول (mol C/D)=R_{tf}×Q_{sc}/(Q_{sc}+Q_{st})×$e^{[-c\times QNDF/(Qsc+Qst)]}$

معادله ۷-۵۵: تخمیر نشاسته (mol C/D) = R_{tf} × Q_{st} / (Q_{sc}+ Q_{st}) × $e^{[-c \times QNDF / (Qsc + Qst)]}$

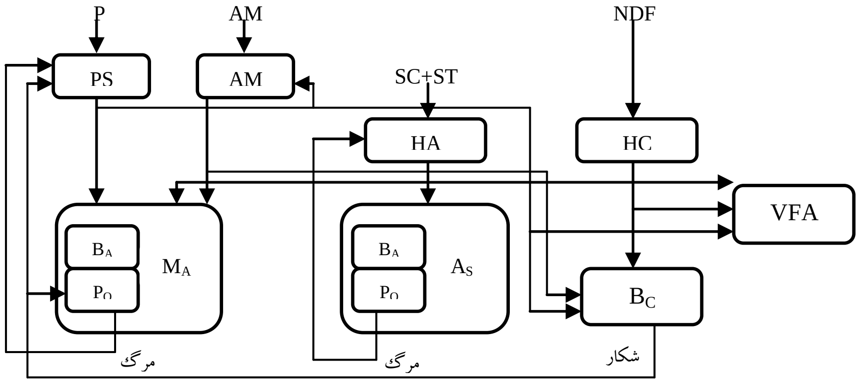
معادله ۷-۵۶: تخمیر فیبر محلول در شوینده خنثی (mol C/D)=R_{tf}×(1 -$e^{[-c \times QNDF / (Qsc + Qst)]}$)

کارشناسان به کمک این معادلات تجربی متوجه شدند که در صورت کاهش نسبت NDF قابل تخمیر، SC و ST قابل تخمیر در جیره به نسبت افزایش می یابد (البته عکس این رابط هم صحیح می باشد). همچنین، ارزش پارامتر c در معادلات فوق بشدت وابسته به نوع جیره بوده و کاهش ارزش آن سبب کاهش هضم کربوهیدرات مصرفی و بالطبع کاهش اسیدهای چرب فرار و توده میکروبی تولید شده در شکمبه می شود. کاهش توده میکروبی با افزایش (Q_{sc} + Q_{st} + Q_{NDF}) در شکمبه مترادف است.

۷-۴-۱-۳ الگوی DI

فاکتورهای ورودی در این الگو همانند سایر الگوها مشخص بوده و توسط روشهای آزمایشگاهی قابل اندازه گیری است. اما تفاوت الگوی DI با سایر الگوها بخاطر روش ارزش گذاری فاکتورهای آن می باشد. در این الگو اسیدیته شکمبه از اهمیت خاصی برخوردار است. اسیدیته شکمبه می تواند بدلیل تعداد کم نمونه برداری ها و یا نامناسب بودن الگوی نمونه برداری دارای نوسان و خطای زیادی باشد. زمانی که pH به زیر ۶ سقوط کند ($T_{6.0}$,h)، خطای ایجاد شده بیشتر می گردد. کمتر شدن ارزش $T_{6.0}$ سبب افزایش فعالیت میکروب های پروتوزوآیی در مخزن باکتری های آمیلولایتیک (MA) که دارای باکتری آمیلولایتیک (BA) و پروتوزوآ (PO) می باشد، می شود. باکتری های آمیلولایتیک بر روی فاکتورهای SC و ST رشد می کنند. افزایش پروتوزوآها سبب شکار بیشتر باکتری های سلولایتیک (BC) که بر روی NDF رشد می نمایند، می شود. با افزایش پروتوزوآها مقدار باکتری های در

دسترس کاهش یافته و نهایتا مرگ پروتوزوآیی رقم می خورد (شکل ۱۸-۷). بیشتر شدن ارزش $T_{6.0}$ (سقوط pH به زیر ۶) سبب کاهش فعالیت باکتری های سلولایتیک و در نتیجه کاهش تجزیه پذیری NDF می گردد.



شکل ۱۸-۷ الگوی DI موثر بر تولید اسیدهای چرب فرار؛ در این الگو آمونیاک (AM)، کربوهیدرات محلول (SC)، نشاسته (ST)، پروتوزوآها (P_O) باکتری های آمیلولایتیک (B_A)، میکروب های آمیلولایتیک (M_A)، پلی ساکاریدهای ذخیره شده در میکروب های آمیلولایتیک (A_S)، باکتری های سلولایتیک (B_C)، فیبر محلول در شوینده خنثی (NDF)، پروتئین محلول (PS)، هگزوز های محلول در شکمبه با منشاء کربوهیدرات محلول و نشاسته (HA)، هگزوزهای محلول با منشاء فیبر محلول در شوینده خنثی (HC) و اسیدهای چرب فرار (VFA) در نظر گرفته شده است.

الگوی DI برعکس الگوی BA که به مفهوم ذرات دینامیکی و روابط آن با خصوصیات شیمیایی ذرات غذایی در شکمبه می پردازد، همچون الگوی DA تنها به رابطه شیمیایی ذرات غذایی در شکمبه و فاکتورهای موثر بر آن مانند نرخ عبور توجه دارد. متابولیسم میکروبی تشریح کننده اصلی الگوی DI محسوب می شود. روابطی چون رشد میکروبی، ذخیره پلی ساکاریدی، تخمیر مواد مغذی و نرخ عبور هر توده میکروبی بیانگر این نوع متابولیسم می باشند. براساس همین موضوع می توان گفت که الگوی DI بشدت به خصوصیات هضمی جیره بواسط تاثیر آن بر اسیدیته و رشد میکروبی وابسته می باشد، در حالیکه این موضوع برای الگوهای BA و حتی DA متفاوت است.

امروزه با وجود مدارک علمی فراوان نمی توان الگوهای ارائه شده را بصورت مجزا یک فرضیه کامل پذیرفت. از آنجا که الگوها همواره برپایه نرخ عبور مواد مغذی بنیان نهاده شده اند، لازم است مبانی نرخ عبور براساس اطلاعات جدید تصحیح گردند. کارشناسان طبق اصول اولیه عبور مواد مغذی از شکمبه بر این باورند که هرگاه ذرات غذایی خرد شده به آستانه عبور برسند از شکمبه خارج خواهند شد. در حالیکه امروزه اثبات شده است که ذرات غذایی بسیار کوچک می توانند به دلیل شناوری بالا و یا چگالی وزنی پایین که تابع خواص فیزیکی- شیمیایی خوراک می باشند، قابل عبور نشوند. این عامل

نشان می دهد که الگوها هر چقدر پیچیده تر شوند، باز در کنار یکدیگر و با فاکتورهای تصحیح شده می توانند شرایط مناسبی را برای شبیه سازی ایجاد نمایند.

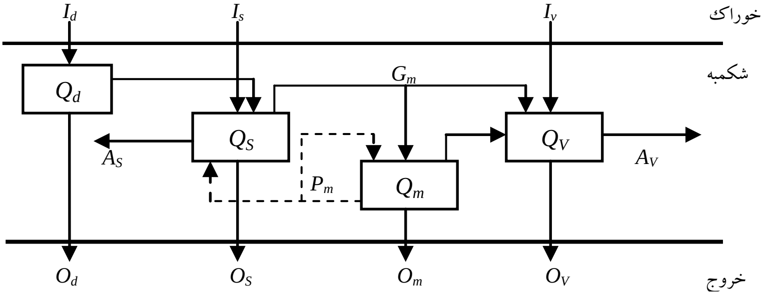
۲-۴-۷ الگوهای جذب اسیدهای چرب فرار

روندهای فیزیولوژیکی که در شکمبه رخ می دهد، بطور قاطع بر اقلام شیمیایی آزاد شده از غذای مصرفی موجود در خون تاثیر می گذارند. بزرگترین روند فیزیولوژیکی مشخص شده تجزیه پذیری مرتبط به اسیدهای چرب فرار است که پس از تولید می تواند جذب دام و یا جذب میکروارگانیسم ها شود. همواره در شبیه سازی های تولید و جذب اسیدهای چرب فرار پنج فرضیه وجود دارد که می تواند انحراف بوجود آمده را در آزمایشات توضیح دهد. این پنج فرضیه عبارتست از:

(۱) الگوهای شکمبه که جهت شبیه سازی روند تولید و جذب اسیدهای چرب فرار بکار می روند، با فرضیه ثابت بودن متغیرها شکل گرفته اند. در صورتی که متغیرهای مورد بررسی در طول مدت آزمایش همواره دارای نوسان زیادی هستند. (۲) الگوهایی که متغیرهای ثابت موجود در شکمبه را برای علوفه ها و مواد متراکم توصیف می کنند، در اصل یک مخزن کلی محسوب می شوند. اما به دلیل تفاوت در نرخ هضم، ترکیب جیره و نرخ عبور بصورت جداگانه نامگذاری می شوند. لذا هنگام بررسی های مزبور لازم است بصورت یکسان و در کنار هم بررسی شوند.(۳) الگوهای ارائه شده، جذب تک تک اسیدها را در مخزن اسید چرب فرار یکسان عنوان نموده اند. اما امروزه مدارک نشان می دهد که جذب هر یک از اسیدهای موجود در مخزن اسید چرب فرار براساس اسیدیته شکمبه، حجم مایعات و تراکم اسید مربوطه متفاوت می باشد. (۴) ارزش ضرایب تبدیل مواد مغذی به اسیدهای چرب فرار یکسان فرض شده است. این در حالی است که برای تولید هر اسید چرب یک ضریب متفاوتی وجود دارد.(۵) نحوه دسترسی میکروب ها به مواد مغذی در الگوها متفاوت است و این تفاوت سبب تغییر میزان اسیدهای چرب فرار جذب یا تولید شده در بین الگوها می شود.

بدین ترتیب، با اصلاح الگوی شکمبه نمی توان بدلیل دگرگونی های متابولیسم میکروبی پیش بینی میزان جذب و یا تولید اسیدهای چرب فرار را تصحیح نمود. لذا تصحیح الگوهای ارائه شده در زمینه تولید و یا جذب اسیدهای چرب فرار نمی تواند یک برداشت واقعی محسوب گردد، ولی می تواند حجتی برای احتمال خطای موجود در پیش بینی واقعی تولید و یا جذب اسیدهای چرب فرار باشد. امروز در مطالعات الگوی جذب اسیدهای چرب فرار بجز بخش متابولیسم میکروبی اصلاحات مناسبی انجام گرفته است. این اصلاحات در دو بخش کلی (۱) ورودی های غیر مداوم، جداسازی مخازن علوفه ای از مواد متراکم قابل هضم و ذرات دینامیکی شکمبه که بر تولید و یا جذب اسیدهای چرب فرار

بواسطه مقدار ماده قابل هضم در روز موثر می باشد و (۲) جذب اسیدهای چرب فرار، نسبت هـای آن و ضرایب اسیدهای چرب فرار که تابع متغیرهای ثابت شکمبه می باشند، صورت گرفت. با در نظر گـرفتن این شرایط می توان یک الگوی ساده برای جذب اسیدهای چرب فرار طراحی نمود. در این الگو همانند شکل ۱۹-۷ یک واحد ماده غذایی و یک گونه میکروبی با نشانه های تعریف شده قرار داده شده است.



شکل ۱۹-۷ الگوی ساده شده غیر خطی وظایف قطعی شکمبه با متغیرهای ثابت؛ در این الگو جذب از شکمبه (A)، قابلیت هضم مواد مغذی غیر محلول (D)، رشد میکروبی از مواد مغذی قابل حل (G)، متغیرهای ورودی با خوراک مصرفی (I)، مرگ یا خرد شدن میکروارگانیسم ها (L)، خروج از شکمبه (O) و شکار میکروبی (P) می باشد. اعداد ارائه شده در طرح شاخص تغییر الگو می باشند که در متابولیسم میکروبی دیده می شود.

متغیرهای ثابت $Q_d(t)$، $Q_s(t)$، $Q_m(t)$ و $Q_V(t)$ مقادیر مواد مغذی قابل تجزیه، مواد مغذی محلول، توده میکروبی و اسیدهای چرب فرار موجود در شکمبه را در واحد زمان به ترتیب تشریح می کنند. نرخ تغییر هر یک از این متغیرهای اعلام شده الگو در واحد زمان عبارتنداز:

معادله ۵۷-۷: $dQ_d/dt = \text{id} - \text{md} - \text{od}$

id = ورود مواد مغذی قابل هضم به شکمبه از طریق خوراک

md = هضم میکروبی مواد مغذی قابل هضم در شکمبه

od = خروج مواد مغذی قابل هضم از شکمبه

معادله ۵۸-۷: $dQ_S/dt = \text{is} + \text{fd} + \text{ms} - \text{sg} - \text{os} - \text{as}$

is = ورود مواد مغذی قابل حل به شکمبه از طریق خوراک

sg = مصرف مواد مغذی قابل حل در رشد میکروبی

fd = شکل گیری مواد مغذی قابل حل با مواد مغذی قابل تجزیه

os = خروج مواد مغذی قابل حل از شکمبه

ms = مواد مغذی قابل حل آزاد شده از تجزیه میکروبی

as = جذب مواد مغذی قابل حل از شکمبه

معادله ۵۹-۷: $dQ_m/dt = \text{gs} + \text{gm} - \text{l} - \text{pm} - \text{om}$

gs = توده میکروبی رشد یافته از مواد مغذی محلول

gm = توده میکروبی رشد یافته از شکار سایر میکروب ها

l = مرگ یا خرد شدن ماده میکروبی

pm = شکار توده میکروبی بوسیله دیگر میکروارگانیسم ها

om = خروج توده میکروبی از شکمبه

معادله ۶۰-۷: $dQ_v/dt = \text{iv} + \text{sv} - \text{av} - \text{ov}$

iv = ورود اسیدهای چرب فرار به شکمبه از طریق خوراک

sv = ساخت اسیدهای چرب فرار از طریق تخمیر مواد مغذی محلول یا شکار میکروارگانیسم ها برای رشد سایر میکروب ها

خروج اسیدهای چرب فرار از شکمبه= ov جذب اسیدهای چرب فرار از شکمبه = av

عموما برای توصیف و قرارگیری معادلات ۵۷ تا ۶۰ در الگوی وظایف شکمبه از روش دیفرانسیل با متغیرهای ثابت (n) استفاده می گردد:

معادله ۶۱-۷: $dQ_d/dt = F_d\ (Q_1,\ \ldots\ ,\ Q_n)$ $\quad d = 1, \ldots , n_d$

معادله ۶۲-۷: $dQ_S/dt = F_s\ (Q_1,\ \ldots\ ,\ Q_n)$ $\quad s = n_d + 1, \ldots , n_d + n_s$

معادله ۶۳-۷: $dQ_m/dt = F_m\ (Q_1,\ \ldots\ ,\ Q_n)$ $\quad m = n_d + n_s + 1, \ldots , n_d + n_s + n_m$

معادله ۶۴-۷: $dQ_v/dt = F_v\ (Q_1,\ \ldots\ ,\ Q_n)$ $\quad v = n_d + n_s + n_m + 1, \ldots , n_d + n_s + n_m + n_v$

در معادلات دیفرانسیل فوق d، s، m و v شاخص متغیرهای ثابت، n_d (مخزن مواد مغذی قابل هضم نامحلول)، n_s (مخزن مواد مغذی قابل حلول)، n_m (مخزن میکروبی) و n_v (مخزن اسیدهای چرب فرار) تعداد کل متغیرهای ثابت برای Q_d، Q_s، Q_m و Q_v به ترتیب می باشند. همچنین لازم است معادلات دیفرانسیل ارائه شده جهت بررسی وظایف واقعی شکمبه غیر خطی باشند. معادله جذب برای هر یک از متغیرهای ثابت Q_d، Q_S، Q_m و Q_v به شرح ذیل است:

معادله ۶۱-۷: $dQ_d/dt = I_d(t) - \sum_{d,m} D_d(Q_d,Q_m) - O_d\ (Q_d)$

معادله ۶۲-۷: $dQ_S/dt = I_s(t) + \sum_{d,m} D_d(Q_d,Q_m) + \sum_{m,s} [L_m\ (Q_m,Q_s) - G_m\ (Q_m,Q_s)] - O_s\ (Q_s) - A_s(Q_s)$

معادله ۶۳-۷: $dQ_m/dt = \sum_{d,m,\ m^*} [G_m\ (Q_m,Q_s).f_{Gm}+P_m\ (Q_m,Q_s).f_{Pm} - L_m\ (Q_m,Q_S) - P_m\ (Q_m,Q_s)] - O_m\ (Q_m)$

معادله ۶۴-۷: $dQ_v/dt = I_v(t) + \sum_{m,m^*,s} [G_m\ (Q_s,Q_m).(1-f_{Gm}).f_{Gv} + P_m\ (Q_{m^*},Q_s).(1-f_{Pm}).f_{Pv}] - O_v\ (Q_v) - A_v\ (Q_v)$

f_{Gm} = مواد مغذی بکار رفته در رشد میکروبی که در توده میکروبی قرار گرفته است

f_{Gv} = مواد مغذی بکار رفته در رشد میکروبی که در تخمیر اسیدهای چرب فرار قرار گرفته است

f_{Pm} = بخشی از توده میکروبی اولیه که در توده جدید میکروبی دیده می شود

f_{Pv} = بخشی از توده میکروبی اولیه که به نوعی از اسیدهای چرب فرار تخمیر شده است

این معادلات نشان می دهد که میکروارگانیسم ها (m) هر نوع مواد مغذی (s) را مصرف نمی نمایند، و هر میکروب (m) یک میکروارگانیسم (*m) خاص را شکار می کند. لذا تفاوت الگوهای ارائه شده در جذب و یا تولید اسیدهای چرب فرار همواره تابع متغیرهای ثابت و روابط بین آنها در فرضیه می باشد. همچنین مفهوم یک فرضیه می تواند با بیشتر شدن تعداد متغیرهای شناسایی شده و روابط آنها در متابولیسم میکروبی دقیق تر گردد.

۱-۲-۴-۷ نرخ جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه براساس الگوی DI

اگر چه برای جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه الگوهای زیادی ارائه شده است، اما الگوی DI به دلیل تاثیر دادن اسیدیته بر فرآیند جذب کاملتر به نظر می رسد. در این الگو علاوه بر

تراکم اسیدهای چرب فرار به اسیدیته شکمبه، ظرفیت مخزن مایع، خروج مایعات از مخزن و اشباع بودن رگ های خونی جهت جذب هم توجه خاصی شده است. معادله ارائه شده جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه براساس این الگو عبارتندار:

معادله ۶۵-۷:

$$U_{VFA} = \frac{v_{\max,\,\mathrm{Ab1}}\, Vol^{\,0.75}}{(1+(M1/C_{\mathrm{VFA}})^{p1})\,(1+(\mathrm{pH}/\mathrm{J})^{p2})}$$

در این معادله نرخ جذب اسیدهای چرب فرار (U_{VFA} ,mol/d)، حجم مایع شکمبه (Vol , l)، نرخ جذب حداکثری اسیدهای چرب فرار ($v_{\max,\,\mathrm{Ab1}}$, mol/ld)، پیوستگی ثابت برای جذب اسیدهای چرب فرار ($M1$, mol/d)، تراکم اسیدهای چرب فرار در شکمبه (C_{VFA} , mol/d)، اسیدیته شکمبه (pH)، محدود کننده ثابت برای جذب اسیدهای چرب فرار (J , pH unit) و پارامترهای منحنی سیگموئیدی جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه ($p1$, $p2$) لحاظ شده است. برای ساده تر شدن روند محاسبات نرخ جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه کارشناسان معادله ۶۵-۷ را بصورت معادله ۶۶-۷ تغییر دادند. البته در این دو معادله دو راه کاملا مجزا از جذب اسیدهای چرب فرار دیده می شود، که سبب تفاوت آنها شده است.

معادله ۶۶-۷:

$$U_{VFA} = \frac{v_{\max,\,\mathrm{Ab2}}\, Vol^{\,0.75}}{(1+M2/C_{\mathrm{VFA}})\,(1+(\mathrm{pH}/\mathrm{J})^{p3})}$$

در این معادله ارزش های جذب حداکثری اسیدهای چرب فرار، پیوستگی ثابت برای جذب اسیدهای چرب فرار و پارامتر منحنی سیگموئیدی با معادله قبلی کاملا متفاوت خواهد بود. علت تفاوت جذب اسیدها در این دو معادله به قانون انتقال اسیدهای چرب فرار باز می گردد: مسیر اول جذب تسهیل شده به وسیله پمپ های فعال است که انتقال اسیدهای چرب فرار در آن بطور مجزا (dVFA) و توسط آنیون ها صورت می گیرد. در این مسیر مصرف انرژی مشهود و برای جذب اسیدهای چرب فرار نیازی به اشباع سازی شکمبه نیست. مسیر دوم از طریق انتشار غیر فعال تجمعی اسیدهای چرب فرار (uVFA) از شکمبه به رگ های خونی می باشد. در این مسیر اشباع سازی اهمیت خاص خود را دارد. تراکم uVFA و dVFA شکمبه را می توان از طریق اسیدیته و C_{VFA} بواسط معادله هندرسون – هاسلباخ محاسبه نمود.

معادله ۶۷-۷:

$$U_{\mathrm{u}VFA} = \frac{v_{\max,\,\mathrm{Ab2}}\, Vol^{\,0.75}}{(1+M2/C_{\mathrm{uVFA}})^{1.0}}$$

معادله ۶۸-۷:

$$U_{\mathrm{d}VFA} = \frac{v_{\max,\,\mathrm{Ab2}}\, Vol^{\,0.75}}{(1+M2/C_{\mathrm{dVFA}})^{5.0}}$$

$$C_{\mathrm{VFA}} = C_{\mathrm{uVFA}} + C_{\mathrm{dVFA}}$$

معادله ۶۷-۷ را از طریق معادله ۶۶-۷ در اسیدیته ۴ که dVFA در آن صفر می باشد (J = 6.45 , $p3 = 6.48$)، محاسبه می نمایند. همچنین معادله ۶۸-۷ را در اسیدیته ۸ که uVFA در آن صفر است، محاسبه می کنند. هر دو معادله نشان می دهند که افزایش تراکم اسیدهای چرب فرار نرخ جذب آنها را افزایش خواهد داد.

۳-۴-۷ پیش بینی اسیدهای چرب فرار براساس الگوهای دینامیکی عناصر سازنده

از آنجا که ۹۵ درصد اسیدهای چرب فرار را استات (Ac)، پروپیونات (Pr) و بوتیرات (Bu) تشکیل می دهد، همواره الگونویسی های اسید چرب فرار در مایعات شکمبه حول این سه اسید قرار می گیرد. تغییر اسیدهای چرب فرار به دلیل اثر مستقیم آنها بر تولید چربی شیر (Ac , Bu) و قند خون (Pr) همیشه مدنظر بوده است. اولین عامل اثر گذار بر تولید اسیدهای چرب فرار و نسبت بین آنها جیره غذایی و مواد مغذی موجود در آن می باشد. بعد از جیره غذایی تولید اسیدهای چرب فرار و نسبت های آن تحت تاثیر اسیدیته شکمبه قرار می گیرد. اسیدیته مستقیما تحت تاثیر اسیدهای چرب فرار و هیدروژن انباشته شده در شکمبه می باشد. در پیش بینی اسیدهای چرب فرار از طریق الگوی عناصر سازنده متغیرهای ورودی را ثابت و شرایط مخزن را پایدار فرض نموده و در این الگو نرخ مواد مغذی بکار رفته توسط میکروارگانیسم ها را ورودی در نظر می گیریم (Ui). مواد مغذی شامل سلولز (Ce)، همی سلولز (Hc)، نشاسته (St)، دیگر کربوهیدرات محلول و سریع التخمیر (Sc) و پروتئین (Pr) می باشد. مواد مغذی بکار رفته توسط میکروب ها در توده میکروبی (Mi) قرار می گیرد و یا به اسیدهای چرب فرار، آمونیاک و سایر تولیدات تخمیری مانند گازها تخمیر می شود. با وجود اینکه آمونیاک و گازهای تخمیری در هنگام بررسی تعادل کربن به ازت مهم محسوب می شوند، اما در مطالعات اسیدهای چرب فرار مورد بررسی قرار نمی گیرند. نرخ تولید توده میکروبی (P_{Mi} , g/d) از معادله ۶۹-۷ محاسبه می شود. در این معادله بخش مواد مغذی بکار رفته در توده میکروبی ($f_{i,Mi}$، مول مواد مغذی بکار رفته در توده میکروبی از هر مول مواد مغذی بکار رفته) و ضریب بازده تغییر مواد مغذی به توده میکروبی ($Y_{Mi,i}$، گرم توده میکروبی از هر مول مواد مغذی بکار رفته) منظور شده است.

$$P_{Mi} = [(f_{Mi,Sc} \times Y_{Mi,Sc} \times U_{Sc}) + (f_{Mi,St} \times Y_{Mi,St} \times U_{St}) + (f_{Mi,Hc} \times Y_{Mi,Hc} \times U_{Hc}) + (f_{Mi,Ce} \times Y_{Mi,Ce} \times Uc_e) + (f_{Mi,Pt} \times Y_{Mi,Pt} \times U_{Pt})]$$ معادله ۶۹-۷:

نرخ تولید اسیدهای چرب فرار (P_{VFA} , mol/d) از معادله ۷۰-۷ بدست می آید. ضریب بازده تغییر مواد مغذی به اسیدهای چرب فرار ($Y_{VFA,i}$) در معادله منظور شده است (واحد آن مول اسید چرب فرار تشکیل شده از هر مول مواد مغذی بکار رفته می باشد).

$$P_{VFA} = [((1- f_{Mi,Sc}) \times U_{Sc}) + ((1- f_{Mi,St}) \times U_{St}) + ((1- f_{Mi,Hc}) \times U_{Hc}) + ((1- f_{Mi,Ce}) \times Uc_e) + ((1- f_{Mi,Pt}) \times U_{Pt}) \times Y_{VFA,i}]$$ معادله ۷۰-۷:

وقتی که فرض گرفته شود بازده میکروبی بر تخمیر کربوهیدرات و پروتئین برابر با Y_{Mi} است و $f_{Mi,Sc} = f_{Mi,St} = f_{Mi,Hc} = f_{Mi,Ce} = f_{Mi,Pt} = f_{Mi}$ است، معادلات ۶۹-۷ و ۷۰-۷ به ترتیب به معادلات ۷۱-۷ و ۷۲-۷ ساده تر می شوند:

معادله ۷۱-۷: $P_{Mi} = [U_{Sc} + U_{St} + U_{Hc} + Uc_e + U_{Pt}] \times f_{Mi} \times Y_{Mi}$

معادله ۷۲-۷: $P_{VFA} = [U_{Sc} + U_{St} + U_{Hc} + Uc_e + U_{Pt}] \times (1\text{-} f_{Mi}) \times Y_{VFA,\, i}$

از طرف دیگر شناسایی تفاوت نوع اسیدهای چرب حاصل از مواد مغذی به الگوی سازنده و نوع مواد مغذی سازنده وابسته می باشد. در این رابط چهار نوع اسید چرب استات، پروپیونات، بوتیرات و اسیدهای چرب شاخه دار (Bc) و پنج نوع ماده مغذی اولیه نشاسته، کربوهیدرات محلول، پروتئین، سلولز و همی سلولز شناسایی گردید. برای تشکیل معادلات پیش بینی نوع اسید چرب فرار به ضریب عناصر سازنده اسیدهای چرب ($Y_{VFA,i}$) نیاز است که بیانگر تغییر مواد مغذی خاص به اسیدهای چرب فرار خاص می باشد. همچنین براساس مسیرهای بیوشیمیایی شناخته شده فرض بر این است یک مول مونومر کربوهیدرات دو مول استات یا پروپیونات و یک مول بوتیرات یا اسید چرب شاخه دار تولید و یک مول مونومر پروتئینی ۰/۵۵ مول کربوهیدرات تولید می نماید. لذا با جایگزینی موارد فرض شده در معادله ۷۰-۷ می توان معادلات نرخ تولید اسید چرب فرار خاص را طراحی نمود:

معادله ۷۳-۷: $P_{Ac} = [\,(Y_{Ac,Sc} \times U_{Sc}) + (Y_{Ac,St} \times U_{St}) + (Y_{Ac,Hc} \times U_{Hc}) + (Y_{Ac,Ce} \times Uc_e)] \times 2 + [(Y_{Ac,Pt} \times U_{Pt} \times 1/1)\,] \times (1\text{-} f_{Mi})$

معادله ۷۴-۷: $P_{Pr} = [\,(Y_{Pr,Sc} \times U_{Sc}) + (Y_{Pr,St} \times U_{St}) + (Y_{Pr,Hc} \times U_{Hc}) + (Y_{Pr,Ce} \times Uc_e)] \times 2 + [(Y_{Pr,Pt} \times U_{Pt} \times 1/1)\,] \times (1\text{-} f_{Mi})$

معادله ۷۵-۷: $P_{Bu} = [\,(Y_{Bu,Sc} \times U_{Sc}) + (Y_{Bu,St} \times U_{St}) + (Y_{Bu,Hc} \times U_{Hc}) + (Y_{Bu,Ce} \times Uc_e)] \times 1 + [(Y_{Bu,Pt} \times U_{Pt} \times 0/55)\,] \times (1\text{-} f_{Mi})$

معادله ۷۶-۷: $P_{Bc} = [\,(Y_{Bc,Sc} \times U_{Sc}) + (Y_{Bc,St} \times U_{St}) + (Y_{Bc,Hc} \times U_{Hc}) + (Y_{Bc,Ce} \times Uc_e)] \times 1 + [(Y_{Bc,Pt} \times U_{Pt} \times 0/55)\,] \times (1\text{-} f_{Mi})$

همچنین می توان با فرض حالت پایدار و ورودی های ثابت، تراکم اسیدهای چرب فرار (C_{VFA}، مول اسید چرب فرار در هر لیتر) را از طریق نرخ تولید اسیدهای چرب فرار (P_{VFA}) محاسبه نمود. در معادلات تراکم اسیدهای چرب فرار نرخ جذب تک تک اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه ($k_{Abc,i}$ /d)، نرخ عبور تک تک اسیدهای چرب فرار توسط مایع شکمبه ($k_{Out,i}$ /d) و حجم مایع در شکمبه (V_{Ru}, /L) منظور شده است.

معادله ۷۷-۷: $C_{Ac} = P_{Ac} / [\,(k_{Abc,Ac} + k_{Out,Ac}) \times V_{Ru}\,]$

معادله ۷۸-۷: $C_{Pr} = P_{Pr} / [\,(k_{Abc,Pr} + k_{Out,Pr}) \times V_{Ru}\,]$

معادله ۷۹-۷: $C_{Bu} = P_{Bu} / [\,(k_{Abc,Bu} + k_{Out,Bu}) \times V_{Ru}\,]$

معادله ۸۰–۷: $C_{Bc} = P_{Bc} / [(k_{Abc,Bc} + k_{Out,Bc}) \times V_{Ru}]$

نسبت های مولار تراکم اسیدهای چرب فرار ($p_{i,VFA}$، مول اسیدچرب در کـل اسـیدهای چـرب) بـدین طریق محاسبه می شوند:

معادله ۸۱–۷: $p_{Ac,VFA} = C_{Ac} / [C_{Ac} + C_{Pr} + C_{Bu} + C_{Bc}]$

معادله ۸۲–۷: $p_{Pr,VFA} = C_{Pr} / [C_{Ac} + C_{Pr} + C_{Bu} + C_{Bc}]$

معادله ۸۳–۷: $p_{Bu,VFA} = C_{Bu} / [C_{Ac} + C_{Pr} + C_{Bu} + C_{Bc}]$

معادله ۸۴–۷: $p_{Bc,VFA} = C_{Bc} / [C_{Ac} + C_{Pr} + C_{Bu} + C_{Bc}]$

با توجه به جابجایی معادلات C_{VFA} با معادلات $p_{i,VFA}$ در مخرج و صورت می توان ارتباط بین نرخ تولید اسیدهای چرب فرار و نسبت های مولار تراکم اسیدهای چرب فرار را در شرایط پایـدار و ورودی های ثابت به صورت ذیل محاسبه نمود:

معادله ۸۵–۷: $p_{Ac,VFA} = [P_{Ac} / (k_{Abc,Ac} + k_{Out,Ac})] \times (1/\phi)$

معادله ۸۶–۷: $p_{Pr,VFA} = [P_{Pr} / (k_{Abc,Pr} + k_{Out,Pr})] \times (1/\phi)$

معادله ۸۷–۷: $p_{Bu,VFA} = [P_{Bu} / (k_{Abc,Bu} + k_{Out,Bu})] \times (1/\phi)$

معادله ۸۸–۷: $p_{Bc,VFA} = [P_{Bc} / (k_{Abc,Bc} + k_{Out,Bc})] \times (1/\phi)$

$$\phi = [P_{Ac} / (k_{Abc,Ac} + k_{Out,Ac})] + [P_{Pr} / (k_{Abc,Pr} + k_{Out,Pr})] + [P_{Bu} / (k_{Abc,Bu} + k_{Out,Bu})] + [P_{Bc} / (k_{Abc,Bc} + k_{Out,Bc})]$$

از طرفی وقتی مجموعه اسیدهای چرب فرار جذب شـده از دیـواره مخـزن ($k_{Abc,j}$) و عبـوری از آن ($k_{Out,j}$) برابر با کل اسیدهای چرب فرار تولید شده در شکمبه باشد، می تـوان معـادلات ۸۵ تـا ۸۸ را بـه شکل ذیل تغییر داد:

معادله ۸۹–۷: $p_{Ac,VFA} = C_{Ac} / [C_{Ac} + C_{Pr} + C_{Bu} + C_{Bc}] = P_{Ac} / [P_{Ac} + P_{Pr} + P_{Bu} + P_{Bc}]$

معادله ۹۰–۷: $p_{Pr,VFA} = C_{Pr} / [C_{Ac} + C_{Pr} + C_{Bu} + C_{Bc}] = P_{Pr} / [P_{Ac} + P_{Pr} + P_{Bu} + P_{Bc}]$

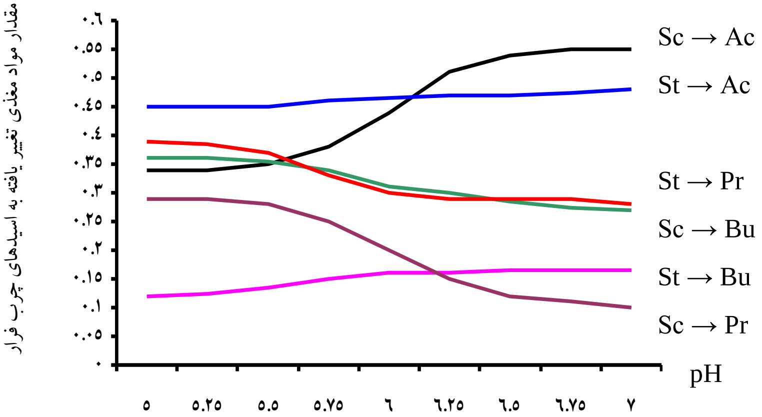
معادله ۹۱–۷: $p_{Bu,VFA} = C_{Bu} / [C_{Ac} + C_{Pr} + C_{Bu} + C_{Bc}] = P_{Bu} / [P_{Ac} + P_{Pr} + P_{Bu} + P_{Bc}]$

معادله ۹۲–۷: $p_{Bc,VFA} = C_{Bc} / [C_{Ac} + C_{Pr} + C_{Bu} + C_{Bc}] = P_{Bc} / [P_{Ac} + P_{Pr} + P_{Bu} + P_{Bc}]$

۴-۴-۷ برنامه مصرف خوراک در الگونویسی اسیدهای چرب فرار

الگوهای ارائه شده و معادلات آنها همـواره بـر هضـم شـیمیایی و فیزیکـی مـواد مغـذی و تولیـدات تخمیری مانند توده میکروبی، اسیدهای چرب فرار، آمونیاک و سایر موارد مانند گازها توجه ویژه نشـان داده است. لذا این الگوها در کنار یکدیگر می توانند بخـوبی روابـط بـین فعالیـت هـای شـکمبه و مـواد مغذی مصرفی را توجیه و تشریح نمایند. برای آنکه بتوان این ارتباطات را در سطح اسیدهای چرب فرار

بررسی نموده و آن را به همه دام ها تعمیم داد، لازم است یک برنامه صحیح و ثابت از خوراک مصرفی ارائه شود. در این برنامه باید به خرد شدن ذرات غذایی، تجزیه پذیری خاص مواد مغذی، متابولیسم و رشد میکروبی، تشکیلات ساختمانی مواد تخمیری بجا مانده از تخمیر (گاز، آمونیاک و ...)، چرخه مواد مغذی در خون، شکمبه و بزاق (اوره و آب)، نرخ عبور تمامی مواد موجود در شکمبه (مواد مغذی، مواد تخمیری و توده میکروبی) و نرخ جذب اقلام تخمیری و غیر تخمیری توجه گردد. آزمایشات نشان داده است که تولید اسیدهای چرب فرار عمدتا تحت تاثیر این سه عامل اساسی می باشد؛ (۱) اسید چرب فرار ایجاد شده به نوع و ترکیب جمعیت میکروارگانیسم های شکمبه وابسته است. با ایجاد تغییر در نوع جیره مصرفی می توان بواسط دگرگونی جمعیت میکروبی، تراکم نوع اسیدهای چرب فرار را دستکاری کرد. (۲) اسیدهای چرب فرار تولید شده به نوع ماده مغذی مصرف شده وابسته می باشد. ماده مغذی می تواند روند فعالیت های شیمیایی را به دلیل انباشته کردن فاکتورهای خاص مانند هیدروژن و یا موارد دیگر، تغییر داده و اسید چرب فرار خاص را منجر شود. (۳) اسیدهای چرب فرار تولید شده در شکمبه به حالت ها و خصوصیات طبیعی مخزن تخمیر مرتبط بوده و این حالت ها به سلامتی مخزن دام، نوع خوراک مصرفی، فصل و شرایط اقلیمی و نوع میکروارگانیسم موجود در مخزن متکی می باشد. یکی از عوامل موثر بر تغییر حالات شکمبه اسیدیته می باشد (شکل ۲۰-۷) که به طور مستقیم تحت تاثیر انباشتگی مواد مغذی سریع التخمیر و اسیدهای چرب فرار است. اسیدیته می تواند روند شیمیایی تولید اسیدهای چرب فرار را قطع نموده و یا آن را تغییر دهد.



شکل ۲۰-۷ تاثیر اسیدیته بر نوع اسیدهای چرب فرار تولید شده از مواد مغذی خاص. در این شکل نشاسته (St)، کربوهیدرات محلول (Sc)، اسید استیک (Ac)، اسید پروپیونات (Pr) و اسید بوتیریک (Bu) منظور شده است.

همانطور که شکل ۲۰-۷ نشان می دهد برنامه های غذایی از طریق تاثیر بر اسیدیته شکمبه می توانند بر تولید و جذب اسیدهای چرب فرار اثر داشته باشند. بطور مثال؛ افزایش اسیدیته شکمبه از ۶ یا ۷ به

۴/۵ تا ۵ سبب کاهش جذب و انباشته شدن اسیدهای چرب فرار تولید شده می گردد. این انباشتن بر تولید اسیدهای چرب فرار اثر بسزایی از طریق اسیدیته خواهد داشت. لذا می توان با یک برنامه غذایی عادت یافته، اسیدیته را کنترل و روند تولید و جذب اسیدهای چرب فرار را مطلوب نمود. در یک برنامه غذایی باید میزان انرژی وارد شده به شکمبه، تعادل ازت به انرژی و موارد موثر بر اسیدیته شکمبه را بررسی و در دستکاری های تولید اسید چرب فرار مدنظر قرار داد.

۷-۵ الگونویسی پروتئین میکروبی

بررسی میزان تجزیه پذیری و سنتز پروتئین میکروبی در شکمبه به دلیل نیاز حیاتی دام به اسیدهای آمینه میکروبی از اهمیت بالایی برخوردار است. کنترل نیتروژن مصرفی به سبب اهمیت تعادل نیتروژن به کربن در تخمیر میکروبی، محققین را بر آن داشت تا درباره تجزیه پذیری، تولید و جذب پروتئین ها الگونویسی های گسترده ای را انجام دهند.

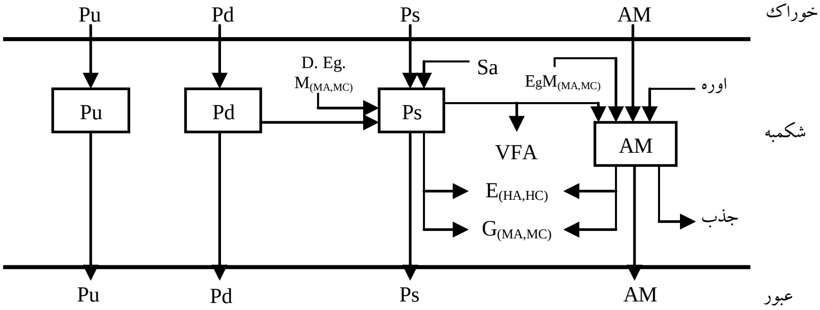
از آنجا که برای الگونویسی صحیح لازم است یک روند مناسب برای حرکت ماده مغذی در تخمیر تعیین گردد، روند بیولوژیکی حرکت نیتروژن در شکمبه ارائه شد. این روند از پپتیدها، اسیدهای آمینه و آمونیاک آغاز و به سنتز پروتئین های میکروبی ختم می گردد. براساس روند مذکور کارشناسان اصلی ترین روش الگونویسی پروتئین را بر مبنای تجزیه پذیری پروتئین توسط کیسه گذاری در شکمبه و شبیه سازی تولید پروتئین میکروبی را از طریق نمونه برداری بوسیله فیستولای شکمبه قلمداد نمودند و معادلات را ارائه کردند.

۷-۵-۱ شبیه سازی فاکتورهای موثر بر متابولیسم پروتئین در شکمبه

الگونویسی پروتئین با مشکلاتی که اسیدهای چرب فرار روبرو بودند، مواجه نیست. بلکه در الگوی مذکور کارشناسان بیشتر با تنوع نیتروژن خارجی (از لحاظ سرعت آزادسازی و نوع نیتروژن مصرفی) و مقدار نیتروژن داخلی براساس نوع خوراک مصرف شده دست و پنجه نرم می کنند. اما مشکلاتی چون فقدان عدم تعمیم معادلات ارائه شده از الگوی تجزیه پذیری پروتئین به همه خوراک ها و ارتباطات پیچیده تولید پروتئین میکروبی با اسیدهای چرب فرار هنوز پابرجا مانده است. طبقه بندی و وارد کردن همه فاکتورهای ورودی به الگوی پروتئین امری مشکل و تقریبا غیرممکن بنظر می آید. با این حال برای بررسی روند الگونویسی در این بخش فاکتورهای وارد شده در شکمبه را ثابت و شکمبه را یک بخش منفرد با مقدار اولیه اسید چرب فرار مورد نیاز فرض می کنیم. لذا براساس این فرضیات می توان یک الگوی کلی از تجزیه پذیری و ساخت پروتئین ترسیم نمود (شکل ۲۱-۷). برای بررسی الگوی ارائه شده علاوه بر سطح و ترکیب جیره مصرفی لازم است فاکتورهای مانند قابلیت بالقوه هضم، بخش محلول

پروتئین مصرفی، کربوهیدرات محلول و قابل تجزیه، نسبت چربی های اشباع و غیر اشباع مصرفی، اسیدیته شکمبه، نرخ عبور و سایر فاکتورهای قابل مشاهده و قطعی محسوب گردند. البته ورودی هر الگو می تواند با الگوی دیگر متفاوت گردد، اما در نهایت باید دارای یکسری فاکتورهای ثابت و مشترک باشند.

در این الگو بخش تجزیه پذیر و غیر تجزیه پذیر پروتئین مصرفی همراه با محلولیت و عدم محلولیت آن از طریق تکنیک کیسه گذاری در شکمبه بدست می آید. در این تکنیک برای بدست آوردن میزان محلولیت و یا تجزیه پذیری پروتئین مصرفی از کیسه های نایلونی به طول و عرض ۱۲× ۶ سانتیمتر و با سوراخ هایی به قطر ۴۵ میلی میکرون استفاده می گردد. با بدست آمدن پارامترهای تجزیه پذیری (a,b,k_d) و به کمک معادله الگوی تناوبی اورسکوف و مکدونالد (معادله ۹۳-۷) می توان میزان تجزیه پذیری پروتئین مصرفی را محاسبه می کنیم.



شکل ۲۱-۷ الگوی ورود مواد نیتروژن دار در مسیر متابولیسم پروتئین؛ در این الگو آمونیاک (AM)، پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه (Pu)، پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (Pd)، پروتئین محلول در مایع شکمبه (Ps)، بزاق (Sa)، رشد میکروب های آمیلولایتیک و سلولایتیک ($G_{(MA,MC)}$)، انرژی حاصل از هگزوز قابل دسترس برای میکروب های آمیلولایتیک و سلولایتیک ($E_{(HA,HC)}$)، مرگ و غوطه وری میکروب های آمیلولایتیک و سلولایتیک (D.Eg. $M_{(MA,MC)}$)، میکروب های آمیلولایتیک و سلولایتیک غوطه ور ($EgM_{(MA,MC)}$) و اسیدهای چرب فرار (VFA) در نظر گرفته شده است.

معادله ۹۳-۷:

$$Y = a + b\,(1 - \exp^{-kdt})$$

a = بخش پروتئینی محلول در آب که از کیسه سریع خارج می گردد

b = بخش پروتئینی قابل تجزیه غیر محلول در آب با سرعت تجزیه پذیری کم

k_d = نرخ تجزیه پذیری بخش (b) در ساعت که ثابت است

t = زمان لازم جهت تجزیه پذیری

قابلیت تجزیه پذیری موثر پروتئین مصرفی براساس نرخ عبور از شکمبه و عبارتست از:

معادله ۹۴-۷:

$$P = a + [(b \times k_d) / (k_d \times k_p)]$$

نرخ عبور پروتئین مصرفی در ساعت = k_p

از آنجا که زمان برای آماده شدن مواد غذایی جهت تجزیه پذیری لازم است، می توان فاز تاخیری یا زمان از دست رفته جهت تجزیه پذیری را همراه با معادلات ۹۳ و ۹۴ جهت تکمیل تر کردن معادله تجزیه پذیری الگوی تناوبی پروتئین مصرفی بکار برد:

معادله ۹۵-۷: $P = a + [(b \times k_d) / (k_d \times k_p)] \times [1 - \exp^{-kd\,(t - l \times t)}]$

مرحله فاز تاخیری = l

با وجود اینکه این معادلات می توانند پروتئین قابل تجزیه در شکمبه را محاسبه نمایند، ولی قابلیت کیفیت جذبی پروتئین را نمی توانند بیان کنند. لذا الگوی MP (MP = DMP + DUP) را در معادلات جدید وارد کردند و میزان کیفیت پروتئین مصرفی را براساس اسیدهای آمینه جذب شده تعیین نمودند. سهم پروتئین میکروبی (DMP) در جذب اسیدهای آمینه را می توان از طریق ([DMP = 0.85×0.75×y] FME) محاسبه کرد. روش محاسبه میزان FME و y در فصل دوم اشاره شده است. ضریب ۷۵ درصد شامل میزان پروتئین میکروبی است که بصورت پروتئین حقیقی بوده و ۸۵ درصد آن میزان قابلیت هضم حقیقی آن را در روده نشان می دهد (می توان با تخمین ترکیبات پورینی ادرار میزان سهم پروتئین میکروبی را محاسبه کرد). همچنین پروتئین غیر قابل تجزیه قابل جذب (DUP) را می توان از طریق معادله ۹۶-۷ محاسبه نمود:

معادله ۹۶-۷: $DUP = 0.9\ [\ CP\ (1 - a - [(b \times k_d) / (k_d + k_p)] - 6.25\ ADIN]$

نیتروژن محلول در شوینده اسیدی = ADIN

پس براساس این فرضیه می توان MP را پروتئین حقیقی نامید. اما پروتئین ها در شکمبه به دو بخش اساسی قابل تجزیه (RDP) و غیر قابل تجزیه (RUP) تقسیم می شوند. هر چند بخش غیر قابل تجزیه می تواند به دو بخش قابل جذب (DUP) و غیر قابل جذب (UDP) تقسیم گردد. برای تعیین میزان RDP و RUP از الگوی کورنل (CNCPS) استفاده می گردد. در این سیستم طبقه بندی خاصی از تجزیه پذیری دیده می شود که شامل:

۱- (A) همان مواد نیتروژن دار غیر پروتئینی می باشند که در صفر درجه یا در سرعت بسیار بالا تجزیه می شود. در این حالت k_d بی نهایت سریع فرض می شود و توسط مایع سریع خارج می شود.

۲- (C) مقدار پروتئینی است که همراه فیبر محلول در شوینده اسیدی (ADF) اندازه گیری می شود. این پروتئین متصل به لیگنین، سلولز و تانن می باشد که پس از آزاد شدن از لیگنین ADIN نام می گیرد و می تواند بعنوان نشانگر استفاده شود.

۳- (B) بخشی از پروتئین است که قابلیت تجزیه پذیری در شکمبه را دارا بوده و به سه بخش سریعتر (B_1)، کند (B_2) و کندتر (B_3) براساس k_d تقسیم می شود. در این حالت می توان میزان B_3 را از تفاوت پروتئین خام بازیافت شده بوسیله NDF (پروتئین حاصل از NDF را NDIN می نامند) و ADF (بخش C) بدست آورد و B_1 که توسط تری کلرواستیک رسوب می کند، محاسبه نمود. همچنین B_2 را می توان توسط معادله ذیل محاسبه کرد: ($B_2 = CP - [B_3 + B_1 + C + A]$).
محاسبه مقادیر RDP و RUP توسط سیستم کورنل و با کمک معادله ۹۵-۷ بدین صورت خواهد بود:

معادله ۹۷-۷:
$$RDP = A + B_1 [k_d B_1 / (k_d B_1 + k_p)] + B_2 [k_d B_2 / (k_d B_2 / (k_d B_2 + k_p)] + B_3 [k_d B_3 / (k_d B_3 + k_p)]$$

معادله ۹۸-۷:
$$RUP = B_1 [k_P /(k_d B_1 + k_p)]+ B_2 [k_P /(k_d B_2 / (k_d B_2 + k_p)]+ B_3 [k_P /(k_d B_3 + k_p)]+ C$$

معادلات ۹۷ و ۹۸ را می توان براساس درصدی از پروتوئین مصرفی به صورت ذیل ساده تر نمود:

معادله ۹۹-۷:
$$RDP = A + B [k_d / (k_d + k_p)]$$

معادله ۱۰۰-۷:
$$RUP = B [k_P / (k_d + k_p)] + C$$

بخش (A)، درصدی از پروتئین مصرفی = A

بخش (B)، درصدی از پروتئین مصرفی = B

بخش (C)، درصدی از پروتئین مصرفی = C

۲-۵-۷ مخزن تخمیری میکروب ها در متابولیسم پروتئین

میکروارگانیسم های شکمبه در متابولیسم پروتئین ها به دو مخزن کلی میکروب های آمیلولایتیک (Ma) و سلولایتیک (Mc) تقسیم می شوند. ضرورت حضور این مخازن قبلا بحث گردیده است. مواد مغذی وارد شده در شکمبه تحت هر عنوانی به یکی از این دو مخزن وارد و به توده میکروبی و تولیدات آنها که حاوی انرژی و پروتئین مصرف شده می باشند، تبدیل می شود. این دو مخزن دوباره جهت آزادسازی انرژی و پروتئین خود در شکمبه توسط پروتوزئرها شکار می شوند. لذا در هنگام الگونویسی می بایست اثرات متقابل میکروارگانیسمی را در چرخه انرژی و پروتئین مد نظر قرار داد. در این الگو (شکل ۱۵-۷) براساس فرضیه چرخه مواد مغذی شکمبه خواص پروتوزوآیی به صورت بطئی در مخزن آمیلولایتیک قرار داده شده است. علت قرار گیری پروتوزوئرها در مخزن آمیلولایتیک مربوط به استفاده منبع کربنی نشاسته و قندهای محلول توسط آنها می باشد. همچنین، تمامی معادلات بکار رفته در الگوی متابولیسم پروتئین براساس روابط میکائیلیس– منتون و یا تشکیلات فعالیت توده ای عنوان شده است. معادلات میکائیلیس- منتون در انتقال مواد مغذی و یون ها از دیواره سلول میکروبی و کشت سلول های میکروبی و بررسی حالات آنها کاربرد مطلوبی دارد.

۱-۲-۵-۷ مخزن تخمیری میکروب های آمیلولایتیک (Q_{Ma}) به گرم

منبع نیتروژنی این مخزن شامل سه ورودی ثابت آمونیاک، پروتئین محلول و ماده میکروبی غوطه ور در مایع شکمبه می باشد (معادلات ۱۰۲، ۱۰۳ و ۱۰۴). میزان بازده میکروبی هر یک از منابع نیتروژنی را می توان با تجزیه شیمیایی میکروب ها بدست آورد. پروتئین میکروبی غوطه ور شده می تواند در سلول پروتوزوآیی موجود در این مخزن به اسیدهای چرب فرار و آمونیاک تغییر و یا در درون مایع شکمبه آزاد شود (در معادله توازن ۱۴۱-۷ قرار گرفته است). مقدار پروتئین میکروبی غوطه ور شده در مایع شکمبه از تفاوت مقدار کل پروتئین میکروبی غوطه ور شده با مقدار پروتئین غوطه ور شده در سلول پروتوزوآیی بدست می آید. البته مقدار پروتئین میکروبی غوطه ور شده در سلول پروتوزوآیی و تغییر آن به آمونیاک و اسیدهای چرب فرار به میزان انرژی قابل دسترس پروتوزوآها مرتبط بوده و برابر با کارآیی پروتئین برای رشد میکروبی است (معادله ۱۳۵-۷). میکروب های آمیلولایتیک در مایع شکمبه آزاد هستند و همراه مایع شکمبه خارج می شوند (معادله ۱۰۶-۷). در این مخزن ماندگاری انتخابی پروتوزوئرها در تمامی بررسی ها گزارش شده است و در شرایط پایدار حذف آنها جهت توازن رشد عموما به دلیل مرگ و خرد شدن آنها می باشد. همواره نسبت کمی از پروتوزوئرها در مقابل سایر میکروارگانیسم ها از شکمبه شسته می شوند. بر پایه همین فرضیه نرخ خروج پروتوزوئرها از شکمبه یک و نیم برابر نرخ عبور فاز جامد می باشد (معادله ۱۱۲-۷). و براساس نرخ مرگ و میر پروتوزوئرها، نرخ خروج آنها با باکتری های آمیلولایتیک متفاوت خواهد بود (معادله ۱۱۰-۷).

معادله ۱۰۱-۷:	$C_{Ma} = Q_{Ma} / V_{Ru}$	معادله غلظت مخزن
معادله ۱۰۲-۷:	$P_{Ma,AmMa} = Y_{Ma,AmMa} \times U_{Am,AmMa}$	معادلات فاکتورهای ورودی مخزن
معادله ۱۰۳-۷:	$P_{Ma,PsMa} = Y_{Ma,PsMa} \times U_{Ps,PsMa}$	
معادله ۱۰۴-۷:	$P_{Ma,McMa} = Y_{Ma,McMa} \times U_{Mc,McMa}$	
معادله ۱۰۵-۷:	$U_{Ma,MaMd} = k_{MaMd} \times Q_{Ma} \times f_{Po,Ma}$	معادلات فاکتورهای خروجی مخزن
معادله ۱۰۶-۷:	$U_{Ma,MsEx} = k_{MaMd} \times Q_{Ma} \times (1 - f_{Po,Ma})$	
معادله ۱۰۷-۷:	$U_{Ma,PoEx} = k_{PoEx} \times Q_{Ma} \times f_{Po,Ma}$	
معادله ۱۰۸-۷:	$dQ_{Ma} / dt = P_{Ma,AmMa} + P_{Ma,PsMa} + P_{Ma,McMa} - U_{Ma,MaMd} - U_{Ma,MsEx} - U_{Ma,PoEx}$	نرخ تغییر مخزن
معادله ۱۰۹-۷:	$U_{Mc,McMa} = U_{Mc,McEg} / (1 + M_{Ha,McMa} / C_{Ha})$	معادلات کمکی
معادله ۱۱۰-۷:	$k_{MaMd} = k_{MaEx} - k_{PoEx}$	
معادله ۱۱۱-۷:	$k_{MaEx} = k_{FlEx}$	

معادله ۱۱۲-۷: $k_{PoEx} = 1 / 2 \times k_{SoEx}$ معادلات کمکی

Po = پروتوزوئرها
Ha = کربوهیدرات قابل دسترس میکروب های آمیلولایتیک
Fl = مایع شکمبه
Md = مرگ میکروبی
Vi = حجم برای فاکتور i
Ex = خروج از شکمبه و ورود به بخش بعدی
Q_i = مقدار
C_i = غلظت فاکتور i
$Y_{i,jk}$ = تولید فاکتور i بوسیله معادله j-k
$P_{i,jk}$ = نرخ تولید فاکتور i بوسیله معادله j-k
$f_{i,jk}$ = بخش فاکتور i بوسیله معادله j-k
$U_{i,jk}$ = نرخ کاربرد فاکتور i بوسیله معادله j-k
$Y_{i,jk}$ = تولید فاکتور i بوسیله معادله j-k
k_{ij} = نرخ ثابت فعالیت توده برای معادله i-j
$M_{i,jk}$ = ثابت میکائیلیس- منتون برای فاکتور i بوسیله معادله j-k

۲-۲-۵-۷ مخزن تخمیری میکروب های سلولایتیک (QMc) به گرم

این مخزن دارای دو منبع نیتروژنی ثابت به نام کربوهیدرات و آمونیاک (معادله ۱۱۴-۷) یا پروتئین محلول (معادله ۱۱۵-۷) می باشد. همچنین در این مخزن دو خروجی غوطه ور توسط پروتوزوئرها (معادله ۱۱۶-۷) و شستشو از شکمبه (معادله ۱۱۷-۷) دیده می شود. میکروب های سلولایتیک برعکس آمیلولایتیک به ذرات غذایی چسبیده و با فاز جامد از شکمبه عبور می کنند. معادله نرخ های غوطه وری در این بخش از دگرگونی معادله میکائیلیس– منتون براساس مطالعات آزمایشگاهی بر روی دو گونه باکتریایی اپیدینیوم (*Epidinium*) و انتودینیوم (*Entodinium*) بدست آمده است. بر همین اساس یک معادله کلی از نرخ غوطه وری (معادله ۱۱۹-۷) یک گرم توده میکروبی از توده میکروب های فیبرولایتیک طراحی شده است.

معادله ۱۱۳-۷:	$C_{Mc} = Q_{Mc} / V_{Ru}$	معادله غلظت مخزن
معادله ۱۱۴-۷:	$P_{Mc,AmMc} = Y_{Mc,AmMc} \times U_{Am,AmMc}$	معادلات فاکتورهای
معادله ۱۱۵-۷:	$P_{Mc,PsMc} = Y_{Mc,PsMc} \times U_{Ps,PsMc}$	ورودی مخزن
معادله ۱۱۶-۷:	$U_{Mc,McEg} = {}^{V}{}_{McEg} / [\ 1 + M_{Mc,McEg} / (C_{Mc} + C_{Ma}\,(1 - f_{Po,Ma}))]$	معادلات فاکتورهای
معادله ۱۱۷-۷:	$U_{Mc,McEx} = k_{McEx} \times Q_{Mc}$	خروجی مخزن
معادله ۱۱۸-۷:	$dQ_{Mc} / dt = P_{Mc,AmMc} + P_{Mc,PsMc} - U_{Mc,McEg} - U_{Mc,McEx}$	نرخ تغییر مخزن
معادله ۱۱۹-۷:	${}^{V}{}_{McEg} = {}^{V^\circ}{}_{McEg} \times Q_{Ma} \times f_{Po,Ma} \times C_{Mc} / [C_{Mc} + C_{Ma}\,(1 - f_{Po,Ma})]$	معادلات کمکی
معادله ۱۲۰-۷:	$k_{McEx} = k_{SoEx}$	

${}^{V}{}_{jk}$ = شتاب برای معادله j-k
${}^{V^\circ}{}_{jk}$ = حداکثر شتاب برای معادله j-k

۳-۵-۷ مخزن پروتئین های مصرفی در متابولیسم پروتئین

پروتئن های مصرفی در شکمبه به چهار مخزن عمده (۱) پروتئین های قابل تجزیه در شکمبه، (۲) پروتئین های محلول، (۳) پروتئین های غیرقابل تجزیه در شکمبه و (۴) آمونیاک یا ترکیبات نیتروژن دار

غیر پروتئینی تقسیم می شوند. پروتئین مصرفی وارد شده در شکمبه تحت هر عنوانی که باشد به یکی از این چهار مخزن وارد می شوند. سپس پروتئین مصرفی به توده میکروبی و تولیدات آنها که حاوی انرژی و پروتئین مصرف شده می باشند، تبدیل می گردند. الگوی ارائه شده در شکل ۱۵-۷ مراحل ورود و خروج این چهار مخزن را ترسیم نموده است. همچنین توضیحات متغیرهای بکار رفته در معادلات مخازن پروتئین های مصرفی و واحدهای مرتبط با آن در جداول ۵-۷ و ۶-۷ بیان شده است.

۱-۳-۵-۷ مخزن پروتئین قابل هضم (Q_{Pd}) به مول

این مخزن تنها دارای یک ورودی ثابت به نام پروتئین مصرفی می باشد (معادله ۱۲۲-۷). پروتئین های غیر محلولی که توسط آنزیم های پروتئولایتیکی ترشح شده از میکروارگانیسم ها تجزیه می شود، در این مخزن جای می گیرند (معادله ۱۲۳-۷). فرض می شود که حداکثر سرعت هیدرولیز پروتئین ($V^{\circ}_{Pd,Ps}$) برابر با نرخ حداکثری سرعت قرارگیری پروتئین هیدرولیز شده در سلول میکروبی ($V^{\circ}_{Ps,Mc}$, $V^{\circ}_{Ps,Ma}$) است. این روند بطور معکوس بسنده بودن انرژی قابل دسترس میکروارگانیسم ها را نشان می دهد. محاسبه پارامترهای مرتبط با هیدرولیز پروتئین در بخش بعدی توضیح داده خواهد شد. در این مخزن نرخ خروج پروتئین قابل تجزیه در شکمبه بوسیله نرخ خروج فاز جامد محاسبه می شود (۱۲۴-۷).

معادله ۱۲۱-۷:	$C_{Pd} = Q_{Pd} / V_{Ru}$	معادله غلظت مخزن
معادله ۱۲۲-۷:	$P_{Pd,InPd} = Y_{Pd,InPd} \times D_{Pd}$	معادله فاکتور ورودی مخزن
معادله ۱۲۳-۷:	$U_{Pd,PdPs} = {}^{V}{}_{PdPs} / [1 + M_{Pd,PdPs} / C_{Pd}]$	معادلات فاکتورهای خروجی مخزن
معادله ۱۲۴-۷:	$U_{Pd,PdEx} = k_{PdEx} \times Q_{Pd}$	
معادله ۱۲۵-۷:	$dQ_{Pd} / dt = P_{Pd,InPd} - U_{Pd,PdPs} - U_{Pd,PdEx}$	نرخ تغییر مخزن
معادله ۱۲۶-۷:	${}^{V}{}_{PdPs} = {}^{V^{\circ}}{}_{PdPs} \times (Q_{Ma} + Q_{Mc})$	معادلات کمکی
معادله ۱۲۷-۷:	$k_{PdEx} = k_{SoEx}$	
معادله ۱۲۸-۷:	$M_{Pd,PdPs} = (M^{\circ}_{Pd,PdPs} \times T_{Pd}) / T^{\circ}_{Pd}$	

T_i = زمان ترن آور هضم اجزای (i) خوراکی
$M^{\circ}_{i,jk}$ = ثابت میکائیلیس- منتون برای فاکتور i بوسیله معادله j-k
In = مصرف خوراک
T°_i = عطف زمان ترن آور هضم اجزای (i) خوراکی
D_i = متغیرهای محرک برای فاکتور i

۲-۳-۵-۷ مخزن پروتئین محلول در مایع شکمبه (QPs) به مول

همانطور که در الگو مشخص شده است در این مخزن پنج ورودی ثابت دیده می شود. این ورودی شامل پروتئین مصرف شده در جیره غذایی (معادله ۱۳۰-۷)، ترشحات بزاقی (معادله ۱۳۱-۷)، هیدرولیز پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (معادله ۱۳۲-۷)، مرگ و خرد شدن پروتوزوئرها (معادله ۱۳۳-۷) و

پروتئین باکتریایی غوطه ور شده در مایع شکمبه (معادله ۱۳۴–۷) می باشند. در این مخزن نرخ ترشحات بزاقی (D_{Sa}, L/d) براساس یک جیره کاملا مشخص و استاندارد محاسبه شده است. در تعیین نرخ ترشحات بزاقی تراکم ماده خشک مصرفی و اندازه ذرات غذایی همراه با فیبر محلول در شوینده خنثی در نظر گرفته شده است.

$$D_{Sa} = 4.6 + 9.54\ \mathrm{DMI} + 0.1357\ \mathrm{NDF},\ (r^2 = 0.79)$$

پروتئین موجود در بزاق کاملا محلول فرض می شود و از طریق تفاوت کل نیتروژن بزاق و اوره موجود در بزاق محاسبه می شود. همچنین، فرض می گردد مقدار ماده پروتئینی میکروبی رها شده در مایع شکمبه از تفاوت بین کل پروتئین میکروبی غوطه ور شده و مقدار پروتئین غوطه ور شده در سلول پروتوزوآیی و تخمیر شده بعنوان آمونیاک (معادله ۱۳۸–۷) محاسبه می شود.

از طرف دیگر برای این مخزن پنج خروجی ثابت در نظر گرفته می شود که شامل قرار گرفتن پروتئین محلول در مسیر تخمیر میکروب های آمیلولایتیک و سلولایتیک (معادلات ۱۳۵، ۱۳۶، ۱۳۷ و ۱۳۸) و خروج آنها از شکمبه (معادله ۱۳۹–۷) است. بیشتر گونه های باکتریایی می توانند منحصرا از نیتروژن برای رشد استفاده نمایند. بنابراین می توان برای محاسبه نرخ حداکثری نقط اوج گیری آمونیاک (V°_{AmMa} , V°_{AmMc}) و حواشی آن از پارامترهای رشد میکروبی در نشخوارکنندگان تغذیه شده از پروتئین آزاد با انرژی کافی استفاده نمود.

معادله ۱۲۹–۷:	$C_{Ps} = Q_{Ps} / V_{Ru}$	معادله غلظت مخزن
معادله ۱۳۰–۷:	$P_{Ps,InPs} = Y_{Ps,InPs} \times D_{Ps}$	معادلات فاکتورهای ورودی مخزن
معادله ۱۳۱–۷:	$P_{Ps,SaPs} = Y_{Ps,SaPs} \times D_{Sa}$	
معادله ۱۳۲–۷:	$P_{Ps,PdPs} = Y_{Ps,PdPs} \times U_{Pd,PdPs}$	
معادله ۱۳۳–۷:	$P_{Ps,MaMd} = Y_{Ps,MaMd} \times U_{Ma,MaMd}$	
معادله ۱۳۴–۷:	$P_{Ps,McPs} = Y_{Ps,McPs} \times U_{Mc,McPs}$	
معادله ۱۳۵–۷:	$U_{MaPs,PsAm} = {}^{V}{}_{Ma,PsAm} / [(1 + M_{Ps,PsAm}/C_{Ps}) + (C_{Ps} / J_{Ha,PsAm})]$	معادلات فاکتورهای خروجی مخزن
معادله ۱۳۶–۷:	$U_{McPs,PsAm} = {}^{V}{}_{Mc,PsAm} / [(1 + M_{Ps,PsAm}/C_{Ps}) + (C_{Ps} / J_{Hc,PsAm})]$	
معادله ۱۳۷–۷:	$U_{Ps,PsMa} = {}^{V}{}_{PsMa} / [(1 + M_{Ps,PsMa}/C_{Ps}) + (M_{Ha,PsMa}/C_{Ha})]$	
معادله ۱۳۸–۷:	$U_{Ps,PsMc} = {}^{V}{}_{PsMc} / [(1 + M_{Ps,PsMc}/C_{Ps}) + (M_{Hc,PsMc}/C_{Hc})]$	
معادله ۱۳۹–۷:	$U_{Ps,PsEx} = k_{PsEx} \times Q_{Ps}$	
معادله ۱۴۰–۷:	$dQ_{Pd} / dt = P_{Ps,InPs} + P_{Ps,SaPs} + P_{Ps,PdPs} + P_{Ps,MaMd} + P_{Ps,McPs} - U_{MaPs,PsAm} - U_{McPs,PsAm} - U_{Ps,PsMa} - U_{Ps,PsMc} - U_{Ps,PsEx}$	نرخ تغییر مخزن

معادله ۱۴۱-۷:	$U_{Ma,McPs} = U_{Mc,McEg} \times [1 - \{1 / (1 + C_{Ha} / J_{Ha,McAm})\} - \{1 / (1 + M_{Ha,McMa} / C_{Ha})\}]$	
معادله ۱۴۲-۷:	$V_{Ma,PsAm} = V^{\circ}_{PsAm} \times Q_{Ma}$	
معادله ۱۴۳-۷:	$V_{Mc,PsAm} = V^{\circ}_{PsAm} \times Q_{Mc}$	معادلات کمکی
معادله ۱۴۴-۷:	$V_{PsMa} = V^{\circ}_{PsMa} \times Q_{Ma}$	
معادله ۱۴۵-۷:	$V_{PsMc} = V^{\circ}_{PsMc} \times Q_{Mc}$	
معادله ۱۴۶-۷:	$k_{PsEx} = k_{FlEx}$	

$V_{i,jk}$ = j-k شتاب فاکتور i برای معادله $U_{mi,jk}$ = نرخ کاربرد فاکتور i بوسیله معادله j-k در طی افزایش میکروب ها

$J_{i,jk}$ = j-k محدود کننده های ثابت فاکتور I برای معادله

۳-۳-۵-۷ مخزن پروتئین غیر قابل تجزیه شکمبه (Q_{Pu}) به مول

در این مخزن تنها یک ورودی ثابت به نام خوراک مصرفی (معادله ۱۴۸-۷) و یک خروجی ثابت (معادله ۱۴۹-۷) که نرخ عبور آن مانند نرخ عبور فاز جامد است، حضور دارد.

معادله ۱۴۷-۷:	$C_{Pu} = Q_{Pu} / V_{Ru}$	معادله غلظت مخزن
معادله ۱۴۸-۷:	$P_{Pu,InPu} = Y_{Pu,InPu} \times D_{Pu}$	معادله فاکتور ورودی مخزن
معادله ۱۴۹-۷:	$U_{Pu,PuEx} = k_{PuEx} \times Q_{Pu}$	معادله فاکتورخروجی مخزن
معادله ۱۵۰-۷:	$dQ_{Pu} / dt = P_{Pu,InPu} - U_{Pu,PuEx}$	نرخ تغییر مخزن
معادله ۱۵۱-۷:	$k_{PuEx} = k_{SoEx}$	معادلات کمکی

۴-۳-۵-۷ مخزن آمونیاک در شکمبه (Q_{Am}) به مول

این مخزن همانطور که در الگوی شکل ۱۵-۷ نشان داده شده است دارای پنج ورودی ثابت و چهار خروجی ثابت می باشد. ورودی ها شامل آمونیاک حاصل از خوراک مصرفی (معادله ۱۵۳-۷)، اوره انتقال داده شده به شکمبه (معادله ۱۵۴-۷)، پروتئین محلول تخمیر شده در مایع شکمبه (معادله ۱۵۵-۷ و ۱۵۶-۷) و پروتئین حاصل از غوطه ور شدن باکتری ها (معادله ۱۵۷-۷) می باشند. مقدار تولید آمونیاک بوسیله تخمیر پروتئین باکتریایی غوطه ور شده به میزان کربوهیدرات در دسترس وابسته می باشد. یعنی کم شدن کربوهیدرات در دسترس تخمیر پروتئین میکروبی غوطه ور شده در مایع را افزایش داده و آمونیاک را بالاتر می برد.

افزایش آمونیاک می تواند بر میزان اوره مترشحه از بزاق و دیواره شکمبه تاثیر بگذارد. غلظت اوره مترشحه از دیواره شکمبه و بزاق علاوه بر تراکم آمونیاک در شکمبه به تراکم اوره در پلاسمای خون و مقدار ماده آلی قابل هضم در شکمبه وابسته می باشد. البته لازم به ذکر است میزان تراکم اوره در پلاسمای خون هم به میزان نیتروژن موجود در خوراک مصرفی وابسته می باشد. خروجی های مخزن آمونیاک شامل باکتری های آمیلولایتیک (معادله ۱۵۸-۷) و فیبرولایتیک (معادله ۱۵۹-۷)، جذب از

دیواره شکمبه (معادله ۱۶۰-۷) و خروج توسط مایعات از شکمبه (معادله ۱۶۱-۷) می باشند. جذب آمونیاک از دیواره شکمبه و وارد شدن آن به خون بصورت انتشار ساده در نظر گرفته شده که به سطح تماس جهت جذب و یونیزه بودن آمونیاک وابسته می باشد. به همین دلیل جذب آمونیاک با تغییر اسیدیته شکمبه تغییر می نماید (معادله ۱۶۴-۷). اسیدیته می تواند آمونیاک را به یون آمونیوم تغییر و از جذب آن جلوگیری نماید.

معادله ۱۵۲-۷:	$C_{Am} = Q_{Am} / V_{Ru}$	معادله غلظت مخزن
معادله ۱۵۳-۷:	$P_{Am,InAm} = Y_{Am,InAm} \times D_{Am}$	معادلات فاکتورهای ورودی مخزن
معادله ۱۵۴-۷:	$P_{Am,UeAm} = Y_{Am,UeAm} \times {}^{V}{}_{Ue,Am}$	
معادله ۱۵۵-۷:	$P_{MaAm,PsAm} = Y_{Am,PsAm} \times U_{MaPs,PsAm}$	
معادله ۱۵۶-۷:	$P_{McAm,PsAm} = Y_{Am,McAm} \times U_{McPs,PsAm}$	
معادله ۱۵۷-۷:	$P_{Am,McAm} = Y_{Am,PsAm} \times U_{Mc,McAm}$	
معادله ۱۵۸-۷:	$U_{Am,AmMa} = {}^{V}{}_{AmMa} / [(1+ M_{Am,AmMa} / C_{Am})+(M_{Ha,AmMa} / C_{Ha})]$	معادلات فاکتورهای خروجی مخزن
معادله ۱۵۹-۷:	$U_{Am,AmMc} = {}^{V}{}_{AmMc} / [(1+ M_{Am,AmMc} / C_{Am})+(M_{Hc,AmMc} / C_{Hc})]$	
معادله ۱۶۰-۷:	$U_{Am,AmAb} = {}^{V}{}_{AmAb} / [1 + (M_{Am,AmAb} / C_{Am})]$	
معادله ۱۶۱-۷:	$U_{Am,AmEx} = k_{AmEx} \times Q_{Am}$	
معادله ۱۶۲-۷:	$dQ_{Pd} / dt = P_{Am,InAm} + P_{Am,UeAm} + P_{MaAm,PsAm} + P_{McAm,PsAm} + P_{Am,McAm} - U_{Am,AmMa} - U_{Am,AmMc} - U_{Am,AmAb} - U_{Am,AmEx}$	نرخ تغییر مخزن
معادله ۱۶۳-۷:	${}^{V}{}_{UeAm} = V^{\circ}{}_{UeAm} \times V_{Ru} \times f_{Ni,Fe} / [1 + (C_{Am} / J_{Am,UeAm})]$	معادلات کمکی
معادله ۱۶۴-۷:	${}^{V}{}_{AmAb} = V^{\circ}{}_{AmAb} \times V^{0.75}{}_{Ru} [1 + (M_{pH,AmAb} / pH)^{\phi pH,AmAb}]$	
معادله ۱۶۵-۷:	${}^{V}{}_{AmMa} = V^{\circ}{}_{AmMa} \times Q_{Ma} \times (1 - f_{Po,Ma})$	
معادله ۱۶۶-۷:	${}^{V}{}_{AmMc} = V^{\circ}{}_{AmMc} \times Q_{Mc}$	
معادله ۱۶۷-۷:	$U_{Mc,McAm} = U_{Mc,McEg} / [1 + (C_{Ha} / J_{Ha,McAm})]$	
معادله ۱۶۸-۷:	$k_{Am\ Ex} = k_{FlEx}$	

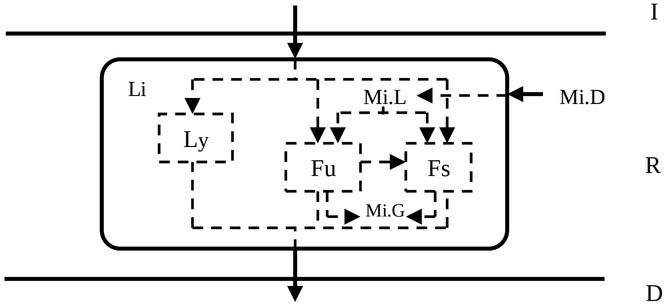
در کل مدل های ریاضی ارائه شده در این مبحث براساس اهمیت و پیچیدگی، بیانگر چگونگی فراهم نمودن ماده مغذی برای اجرای متابولیسم پروتیئن در شکمبه توسط میکروارگانیسم ها می باشد. اگر چه این معادلات در الگوی متابولیسم پروتئین با سایر الگوهای عناصر غذایی در شکمبه ارتباط متقابل دارد، اما جهت فهم ساده تر از ارائه یک الگوی کلی خودداری گردید. البته لازم است جهت فهم صحیح تر از الگوی متابولیسم پروتئین تمامی الگوهای ارائه شده مطالعه و ارتباطات آنها با هم مشخص شود.

۶-۷ الگونویسی چربی ها در شکمبه

چربی ها در شکمبه می توانند تاثیرات شگرفی بر تولیدات تخمیری بگذارنـد. چربـی هـا عـلاوه بـر تامین انرژی می توانند بر حذف فاکتورهای نامطلوب در شـکمبه ماننـد کـاهش غلظـت یـون هیـدروژن (H^+) مبادرت ورزند و یا سبب کاهش هضم مواد مغذی به دلیـل سـطح مصـرف بـالا شـوند. اسـیدهای چرب بلند زنجیره (LCFA) مهمترین نوع چربی ها در تولید انـرژی بـرای میکـروب هـای شـکمبه مـی باشند. هر چقدر میزان غیراشباعی اسیدهای چرب بیشتر باشـد، میـزان تـاثیرات آن در متابولیسـم شـکمبه گسترده تر و محدودیت تخمیری فیبر و سایر اقلام غذایی بیشتر خواهد شد. اسید چرب غیراشباع رقیـب اصلی تولید گاز متان در شکمبه می باشد که با صرف یون هیدروژن همراه است.

۱-۶-۷ شبیه سازی فاکتورهای موثر بر متابولیسم چربی در شکمبه

الگونویسی اسیدهای چرب موجود در شکمبه همواره بصورت مستقل بررسی نگردیده است و علت بررسی آن در الگوهای ارائه شده به دلیل اثر اسید چرب بر تجزیـه پـذیری مـواد مغـذی و کـاهش متـان تولیدی می باشد. الگوی شبیه سازی شده اسیدهای چرب در شکمبه شامل یـک مخـزن چربـی(Q_{Li}) بـه مول با دو ورودی مشخص شامل چربی موجود در خـوراک مصـرفی (معادلـه ۱۷۰-۷) و مـرگ و خـرد شدن میکروب ها بخصوص پروتوزوآها وبـاکتری هـای آمیلولایتیـک (معادلـه ۱۷۱-۷) و یـک فـاکتور خروجی بصورت چربی هیدرولیز و هیدروژنه شده در شکمبه (معادله ۱۷۲-۷) می باشد (شکل ۲۲-۷).



شکل ۲۲-۷ الگوی ورود مواد اسید چرب به شکمبه؛ در این الگو مصـرف خـوراک (I)، شـکمبه (R)، قسـمت بعـدی دستگاه گوارش (D)، مخزن چربی در شکمبه (Li)، مرگ میکروبی (Mi.D)، اسید چـرب بلنـد زنجیـره اشـباع (Fs)، اسید چرب بلند زنجیره غیر اشباع (Fu)، لیپولیز اسید چرب هیدرولیز نشده (Ly)، رشد میکروبی ناشـی از اسـیدهای چرب (Mi.G) و اسید چرب میکروبی ناشی از خرد شدن (Mi.L) در نظر گرفته شده است.

البته این مدل برای جیره های پر از چربی به دلیل اختلال در تخمیر مواد مغذی مناسب نبوده و مخزن ارائه شده در این الگو شامل سه بخش فرعی اسید چرب هیـدرولیز نشـده (Ly)، اسـیدهای چـرب بلنـد زنجیره اشباع شده (Fs) و اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع (Fu) می باشد. همچنین مقـدار چربـی

آزاد شده از خرد شدن میکروب ها، با محاسبه ترکیب شیمیایی میکروب ها در توده زنده میکروبی بدست می آید.

باید در نظر گرفت که نوع الگوی شبیه سازی شده می تواند بر تخمیر شکمبه و درجه اشباع سازی اسیدهای چرب تاثیر شگرفی بگذارد. این تاثیر ناشی از فهم ما در نوع تخمیر و دخالت های غذایی که بر آن انجام می دهیم شروع می شود.

معادله ۱۶۹-۷:	$C_{Li} = Q_{Li} / V_{Ru}$	معادله غلظت مخزن
معادله ۱۷۰-۷:	$P_{Li,InLi} = Y_{Li,InLi} \times D_{Li}$	معادله فاکتور ورودی مخزن
معادله ۱۷۱-۷:	$P_{Li,MaMd} = Y_{Li,MaMd} \times U_{Ma,MaMd}$	
معادله ۱۷۲-۷:	$U_{Li,LiEx} = k_{LiEx} \times Q_{Li}$	معادله فاکتورخروجی مخزن
معادله ۱۷۳-۷:	$dQ_{Li} / dt = P_{Pu,InPu} - U_{Pu,PuEx}$	نرخ تغییر مخزن
معادله ۱۷۴-۷:	$k_{LiEx} = k_{FlEx}$	معادلات کمکی

۱-۱-۶-۷ مخزن چربی هیدرولیز نشده (Q_{Ly})

تنها ورودی اسید چرب به شکمبه از طریق خوراک مصرفی و لیپولیز چربی ها می باشد. همچنین به محض مرگ و خرد شدن میکروب ها، اسیدهای چرب میکروبی در مایع شکمبه آزاد می شود. اما تنها ورودی اسید چرب به مخزن Q_{Ly}، خوراک مصرفی می باشد. و از طرف دیگر برای مخزن Q_{Ly} سه خروجی Fs ، Fu و اسید چرب خارج شده از شکمبه (متصل به مواد جامد) در نظر گرفته می شود. کارشناسان نرخ هیدرولیز اسید چرب در این مخزن را ۹ برابر نرخ عبور مواد جامد از شکمبه فرض می کنند که در این صورت می توان ۹۰ درصد نرخ عبور را نرخ هیدرولیز اسید چرب در این مخزن نام برد.

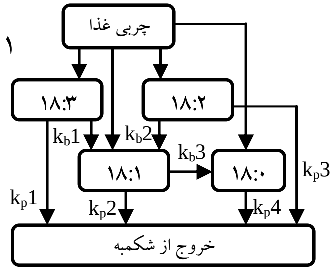
۲-۱-۶-۷ مخزن اسیدهای چرب بلند زنجیره اشباع شده (QFs)

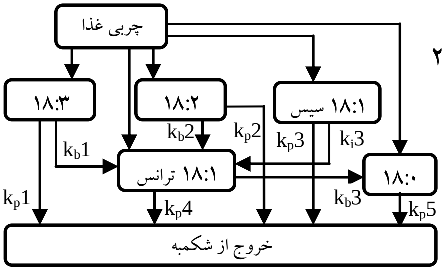
چهار ورودی برای این مخزن شناسایی شده است که شامل: اسید چرب حاصل از خوراک مصرفی، اسید چرب حاصل از خرد شدن میکروب ها، اسید چرب حاصل از بیوهیدروژناسیون اسید چرب غیر اشباع (شکل ۱۷-۷) و اسید چرب حاصل از هیدرولیز چربی ها می باشد. میزان اسید چرب آزاد شده از ماده خشک میکروبی بدون پلی ساکاریدها (gg^{-1}) ۰/۱۴۳ ثابت فرض می شود. همچنین، بخش اسیدهای چرب بلند زنجیره (gg^{-1}) ۰/۷۰ چربی میکروبی و بخش اشباع شده آن (gg^{-1}) ۰/۸۰ اسیدهای چرب بلند زنجیره در نظر گرفته می شود. اگر چه مقدار و ترکیب چربی جیره غذایی ممکن است بر ترکیب چربی ماده خشک میکروبی اثر بگذارد، اما کارشناسان طی یک سلسله آزمایشات مکرر یک ترکیب ثابت برای این منظور در نظر گرفته اند. از طرف دیگر دو خروجی ثابت (۱) مصرف اسید چرب اشباع شده در رشد میکروبی و (۲) خروج اسید چرب اشباع شده از شکمبه برای این مخزن نیز در نظر

گرفته اند. میزان مصرف اسید چرب اشباع شده توسط میکروب ها براساس ۲۰ درصد ترکیب شیمیایی ماده خشک میکروبی محاسبه شده است.

۷-۶-۱-۳ مخزن اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع (QFu)

در این مخزن سه ورودی و سه خروجی ثابت در نظر گرفته شده است که ورودی ها شامل: اسید چرب حاصل از خوراک مصرفی، اسید چرب حاصل از هیدرولیز چربی ها و اسید چرب حاصل از میکروب های خرد شده می باشد. خروجی های این مخزن شامل: مصرف اسید چرب غیر اشباع در رشد میکروبی، خروج اسید چرب از شکمبه و مسیر بیوهیدروژناسیون که سبب تبدیل اسید چرب اشباع از غیر اشباع می شود (شکل ۲۳-۷) ، است. در کل اسیدهای چرب غیر اشباع به سرعت توسط میکروب ها اشباع شده و نرخ مزبور در مخزن Q_{Ly} برابر با نرخ هیدرولیز و ۹ برابر نرخ عبور مواد جامد از شکمبه می باشد. نرخ بیوهیدروژناسیون در این مخزن به شدت وابسته به فعالیت میکروب ها بر روی کربوهیدرات و فیبر موجود می باشد. همچنین، تعداد گونه های میکروبی فعال که می توانند اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند چندگانه را به اسید چرب غیر اشباع با پیوند یگانه تبدیل نمایند، فراوان بوده و این در حالی است که این تعداد میکروب برای تبدیل اسید چرب با پیوند یگانه به اسید چرب اشباع محدود می باشد.





شکل ۲۳-۷ الگوی بیوهیدروژناسیون اسید چرب در شکمبه؛ در الگوی شماره ۱ و شماره ۲ نرخ بیوهیدروژناسیون (k_b)، نرخ عبور (k_p) و نرخ ایزومراسیون در الگوی شماره ۲ (k_i) در نظر گرفته شده است.

برای محاسبه نرخ عبور (k_p) و نرخ بیوهیدروژناسیون (k_b) هر اسید چرب (FA_i) در الگوی فوق از معادلات ذیل استفاده می شود:

معادله ۱۷۵-۷: نرخ ترن آور چربی در شکمبه (درصد در ساعت) $= [F_{fib} \text{ (g/h)} / RFP \text{ (g)}] \times 100$

معادله ۱۷۶-۷: نرخ عبور از شکمبه (درصد در ساعت) $= [DF_f \text{ (g/h)} / RFP \text{ (g)}] \times 100$

معادله ۱۷۷-۷: نرخ ناپدید شدن از شکمبه (درصد در ساعت) $= [RF_{tr} \text{ (g/h)} / RFP \text{ (g)}] \times 100$

معادله ۱۷۸-۷: نرخ بیوهیدروژناسیون در شکمبه (درصد در ساعت) $= F_{dr} \text{ (\%/h)} - F_{pr} \text{ (\%/h)}$

معادله ۱۷۹-۷: مقدار بیوهیدروژناسیون (درصد) $= F_{br} \text{ (\%/h)} / [\, F_{br} \text{ (\%/h)} + F_{pr} \text{ (\%/h)}]$

شاخص بیوهیدروژناسیون ۱۸:۳ (٪) $= 100 - \{100 \times Du[18:3.(total18carbon)^{-1}] / In[18:3 / (total 18carbon)^{-1}]\}$

شاخص بیوهیدروژناسیون ۱۸:۲ (٪) $= 100 - \{100 \times Du[18:2.(total18carbon)^{-1}] / In[18:2 / (total 18carbon)^{-1}]\}$

RFP = مخزن هر اسید چرب شکمبه ایی

F_{fib} = هر اسید چرب سیال درون مخزن مطابق خوراک و بیوهیدروژناسیون

RF_{tr} = نرخ ترن آور هر اسید چرب شکمبه ایی

DF_f = هر اسید چرب جریان یافته به بخش روده ایی

F_{pr} = نرخ عبور هر اسید چرب

F_{dr} = نرخ ناپدید شدن هر اسید چرب

Du = روده

F_{br} = نرخ بیوهیدروژناسیون هر اسید چرب

In = مصرف خوراک

۷-۷ الگونویسی اسیدیته در شکمبه

فاکتورهای موثر بر اسیدیته و مکانیسم های تنظیمی آن می توانند بر شیوه الگونویسی سایر فاکتورهای تخمیری شکمبه اثر بسزایی داشته باشند. بالا رفتن اسیدیته شکمبه و ثابت ماندن آن در سطح بالا سبب کاهش هضم فیبر و سایر مواد مغذی وارد شده به شکمبه می شود. اسیدیته شکمبه به دلیل داشتن ارتباطات تنگاتنگ با تخمیر مواد مغذی می تواند به عنوان یک حساسگر مناسب جهت تعیین وضعیت شکمبه محسوب گردد. این شاخص می تواند اطلاعات خوبی در زمینه جمعیت میکروبی و نوع آن، میزان تخمیر مواد مغذی و جذب آنها ارائه دهد. در الگونویسی اسیدیته شکمبه فهم تنظیم اسیدیته شکمبه و اثر هر یک از اجزای خوراکی بر اسیدیته اهمیت خاصی دارد.

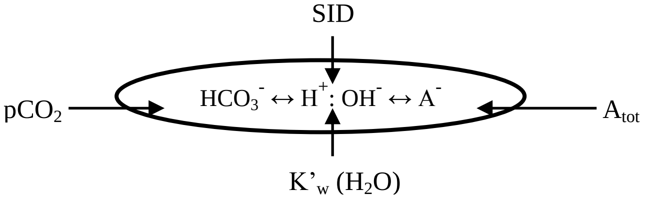
۱-۷-۷ الگوی اسیدیته در شکمبه

اسیدیته شکمبه تابع نرخ تولید و جذب اسیدهای چرب فرار بوسیله میکروب ها و دیواره شکمبه، میزان ترشح مایعات و آب از دیواره شکمبه، میزان ترشحات بزاق، حضور بافرها، اسیدیته و نوع خوراک مصرفی و نرخ تجزیه پذیری آن در دستگاه گوارش می باشد. برای رسیدن به یک شرایط مطلوب در اسیدیته شکمبه باید بین موارد اشاره شده یک رابطه و تنگاتنگی ایجاد نمود. بهترین الگوی ارائه شده جهت تنظیم اسیدیته شکمبه الگوی تفاوت قدرت یونی (Storang Inion Difference) می باشد که براساس سه مفهوم کلی شکل گرفته است؛ (۱) الکترولیت ها در تمامی زمان ها بایستی بصورت تعادلی حفظ گردند (مجموع الکترولیت های مثبت با منفی برابر باشد)، (۲) توده الکترولیتی بایستی ثابت نگهداری شود و (۳) ثابت تفکیک آب تعیین کننده ثابت تفکیک مواد مغذی موجود در آب باشد.

۱-۱-۷-۷ الگوی اختلاف قدرت یونی در تنظیم اسیدیته شکمبه

الگوی اختلاف قدرت یونی (SID) از تفاضل مجموع تراکم آنیون ها و کاتیون ها حاصل می شود. لذا هر منبعی مانند یون هیدروژن ($[H^+] = 10^{-pH}$) و یون هیدروکسیل ($[OH^-] = k_w / [H^+]$) حاصل

از ثابت تفکیک آب ($K'_w = H_2O \times K_w$)، آنیون های پروتئینی و فشار دی اکسیدکربن بتوانـد سـبب تغییر متغیرهـای وابسـته بـه اسـیدیته شـکمبه گـردد (شـکل ۲۴-۷)، سـبب تغییـر مفهـوم SID مـی شـود. بزرگترین فاکتور موثر بر SID به ترتیب شامل جیره غذایی و ترکیب مـواد مغـذی آن، بافرهـا، افـزایش مواد معدنی ناشی از خرد شدن میکروب ها مانند کلر و فسفات، ترکیب بزاق، نرخ رقت مـواد معـدنی و جذب آنها از دیواره می باشد.



شکل ٢٤-٧ تغییر حالت اسید و باز شکمبه براساس قابلیت کنترل یونی. در این الگو فشار دی اکسیدکربن (pCO_2)، تراکم کل پروتئین (A_{tot}) و ثابت تفکیک آب ($K'_w = H_2O \times K_w$) لحاظ شده است.

۲-۱-۷-۷ الگوی بافر در تنظیم اسیدیته شکمبه

بافرها خنثی کنندگان اسیدهای موجود در خوراک یا اسیدهای تولید شـده از هضـم مـواد مغـذی و متابولیسم آنها می باشند که معمولا از نمک یک اسید ضعیف با باز همراه و یا یک باز ضـعیف بـا اسـید همراه حاصل شده است ($HA \leftrightarrow A^- + H^+$). مهمترین بافرهای شناخته شده در شکمبه بیکربنات سـدیم، اکسید منیزیوم و بیکربنات پتاسیم می باشد که قدرت هر بافر بـه ظرفیـت نگهـداری آب در درون بـافر، میزان پروتئین و نشاسته موجود در شکمبه و تغییر قدرت اسمزی مایع شکمبه وابسته است. فعالیت بافر در سیستم به قدرت بافر و تراکم سیستم اسید- باز در یک pH خاص وابسته می باشـد. همچنـین، روشـن و خاموش شدن بافر به ثابت تفکیک (pk_a) بافر وابسته می باشد.

$$pk_a = -\log(k_a)$$

ثابت تفکیک اسید (k_a ,mol^2/L^2) است که نمایانگر قدرت اسید در محلول آبدار می باشد. بنابراین؛

معادله ۱۸۰-۷: $k_a = K_{eq}[H_2O], \rightarrow K_{eq} = [H_3O^+][A^-] / [HA][H_2O],$

این فرمول بیانگر آن است که افزایش ارزش k_a سبب قدرت بیشتر اسید و کمتر شدن pk_a می شود. حال هر قدر میزان pk_a بافر از pk_a اسید کمتر باشد، شدت تاثیر بافر جهت خنثـی سـازی بـالاتر خواهـد بود.

۳-۱-۷-۷ الگوی دی اکسیدکربن در تنظیم اسیدیته شکمبه

بکارگیری نظریه SID می تواند تاثیر فشار دی اکسیدکربن موجود در شکمبه را بر اسیدیته تشریح نماید. گازهای شکمبه و مایعات برای حفظ اسیدیته شکمبه دارای یک توازن حساس و سریع می باشند. روی هم رفته سه ثابت توازن (K_{eq}) برای تعادل بین مایعات شکمبه و گازهای شکمبه وجود دارد که در صورت کاهش هر یک از آنها واکنش به همان سمت سوق می یابد تا به تعادل برسد.

$$HCO_3^- + H^+ \longleftrightarrow H_2CO_3 \longleftrightarrow H_2O + CO_2 \longleftrightarrow CO_2\ (\text{گاز})$$

معادله ۱۸۱-۷: $K_{eq} = [k_1k_2] / [k_{-1}k_{-2}] = ([HCO_3^-] [H^+]) / ([CO_2] [H_2O])$

k_1, k_2 = نرخ ثابت برای بازگشت همه واکنش ها است

k_{-1}, k_{-2} = نرخ ثابت برای انجام همه واکنش ها است

با دوباره طراحی کردن این معادله و گرفتن لگاریتم بر مبنای ۱۰ رابطه هندرسون – هاسلباخ تشکیل می گردد:

معادله ۱۸۱-۷: $pH = pk_a + Log ([HCO_3^-] / [CO_2])$

قابلیت حل دی اکسیدکربن در این موازنه براساس فشار دی اکسیدکربن در اتمسفر بصورت گازی و ثابت هنری (k) محاسبه می شود (($[CO_2]eq$))، عدم حلالیت دی اکسیدکربن در مایع شکمبه می باشد).

$[CO_2]eq = k\ (pCO_2)$

ثابت هنری برای حل دی اکسیدکربن در مایع با قدرت یونی ۰/۱۵ و درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد ۰/۰۲۲۹ (M/atm) می باشد. بنابراین pk_a در سیستم موازنه سه بخشی فوق برابر با ۷/۷۴ خواهد شد. رابطه هندرسون- هاسلباخ براساس ثابت هنری برابر است با:

$pH = 7/74 + Log ([HCO_3^-] / [pCO_2])$

فشار گاز دی اکسیدکربن در مخزن شکمبه وقتی بیشتر از محیط بیرونی می شود طی مکانیسم آروغ تخلیه می گردد، لذا فشار گاز درون با بیرون نمی تواند به تعادل برسد و یکسان نمی باشد.

۴-۱-۷-۷ الگوی اسیدهای چرب فرار در تنظیم اسیدیته شکمبه

اسیدهای چرب فرار تولید شده توسط تخمیر میکروبی دارای pk_a برابر با ۴/۸ ≥ می باشد که در ۶/۸ – ۶/۲ = pH بصورت یونیزه (VFA^-) شده ظاهر و جذب می شوند. نرخ جذب اسیدهای چرب فرار با کاهش اسیدیته زیادتر می شود و این افزایش در نرخ جذب سبب کاهش فشار اسمزی در شکمبه می شود (شکل ۵-۲). تغییرات ناگهانی جیره با مصرف بیش از حد مواد متراکم و انباشته شدن اسیدهای چرب تولیدی و یا تولید بیش از حد اسیدلاکتیک سیستم جذب اسیدهای چرب فرار را به دلیل تغییر اسیدیته شکمبه و افزایش شدید آن تغییر می دهد. افزایش اسیدیته سبب توقف فعالیت های هضمی و جذبی اسیدهای چرب فرار شده و سیستم متوقف می شود. پایین آمدن pH به زیر ۵ سبب کاهش و

متوقف شدن فعالیت های یونیزاسیون اسیدهای چرب فرار در شکمبه شده و آنها را از حالت یونی خارج (VFA°) می کند.

معادله ۱۸۲–۷: $pH = pk_a + Log ([VFA^-] / [VFA°])$

این معادله می تواند برای تعیین میزان اسیدهای چرب فرار یونیزه شده با واحد مول به شکل ذیل تغییر نماید:

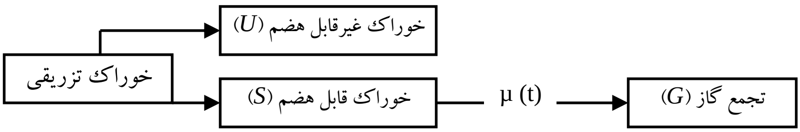
معادله ۱۸۳–۷: $[VFA^-] = 10^{(pH-pka)} x [VFA] / ((10^{(pH-pka)}) + 1)$

۸–۷ الگونویسی تولید گاز در شکمبه

الگوهای بکار رفته در این زمینه می تواند به دو بخش عمده (۱) الگوهای In vitro و (۲) الگوهای In vivo تقسیم شود. این الگوهای ریاضی اجازه می دهند که بدون انجام آزمایشات هزینه بر میزان گاز تولیدی را بصورت تقریبی محاسبه نمود. این الگوها در کل به دو صورت آماری (که براساس نوع خوراک مصرفی طراحی می گردد) و تناوبی دینامیکی (که براساس تخمیر مواد شیمیایی طراحی می شوند) بررسی می گردند. اگر چه تعدادی از الگوهای آماری کاملا در پیش بینی مقدار گاز تولیدی موفق بوده اند، اما بطور عموم تعدادی از فاکتورهای موجود در آن غیر قابل اندازه گیری و یا ارزش آنها خارج از محدوده واقعی می باشد.

۱–۸–۷ الگوی تولید گاز در حالت In vitro

در این حالت یک مقدار ماده غذایی مورد مصرف دام را در یک ظرف تخمیری قرار داده و میزان متان تولیدی را بررسی می نماییم. در این شرایط کارشناسان سه مخزن قابل بررسی بنام S (خوراک قابل هضم برحسب گرم)، U (خوراک غیر قابل هضم برحسب گرم) و G (گاز تجمع یافته برحسب میلی لیتر) پیشنهاد نموده اند که در شکل ۲۵–۷ ارائه شده است.



شکل ۲۵–۷ سه مخزن قابل بررسی In vitro در تولید گاز. تجزیه پذیری در نمودار دارای یک خط سهمی بوده و μ (h^{-1}) نرخ تجزیه پذیری براساس تغییر زمان است. در این حالت فرض می شود که فاز تاخیری صفر می باشد.

رفتارهای دینامیکی دو مخزن غذایی S و U به صورت معادلات ذیل قابل بررسی است:

$dS / dt = 0 \ , \ 0 \leq t < T,$ {۱}

$dS / dt = -\mu S \ , \ t \geq T,$ {۲}

و

$dU / dt = 0 \quad , \quad t \geq 0,$ {۳}

در این معادلات t از زمان آغاز انکوباسیون محاسبه می شود و T زمان فاز تاخیر است. اگر فرض شود که میزان تولید گاز با نرخ تجزیه پذیری مواد غذایی متناسب است، پس؛

$dG / dt = -Y (dS / dt),$ یا $dG / dt = -Y,$ {۴}

در این معادله Y میلی لیتر بر گرم ماده غذایی خشک قابل تجزیه می باشد، که یک فاکتور ثابت در تولید است. نشانه منفی در این معادله به دلیل آنست که G و S در زمان های مختلف متفاوت و در تجمع گاز S خالی می شود. براساس جابجایی فرمول ۲ با ۴ و مشتق گیری آنها معادله ذیل بدست می آید:

$d^2G / dt^2 = YS ([d\mu / dt] - \mu^2), \ t \geq T,$ {۵}

در این معادله وقتی $d\mu / dt$ برابر با μ^2 گردد، نقط خمیدگی منحنی آشکار و d^2G / dt^2 برابر با صفر می گردد. نهایتا کل گاز تجمع یافته در زمان t از انتگرال گیری فرمول ۴ در شرایط ($G = 0 , S = S_0$) محاسبه می شود:

$G = Y (S - S_0),$ {۶}

در صورت رها نمودن مقداری از S باقیمانده در روند تخمیر در زمان t بیان می کند:

$S = S_0 [1 - \varphi(t)], \quad t \geq T,$ {۷}

در این معادله $\varphi(t)$ مثبت بوده و بطور یکنواخت تابع را بین محدوده {۰ تا ۱} با ارزش اولیه $\varphi(t)= 0$ و خط مجانب آن $\varphi(\infty)= 1$ افزایش می دهد. نرخ تجزیه پذیری مواد مغذی (μ) برابر است با:

$\mu = [- 1/S]\times[dS /dt] = [1 / 1 - \varphi]\times[d\varphi/dt],$ {۸}

براساس جابجایی در فرمول های ۶ و ۷ تجمع گاز در مخزن تخمیر برابر است با:

$G = YS_0\varphi(t), \quad t \geq T,$ {۹}

اگر بخواهیم معادلات فوق را در زمینه شکمبه بررسی نماییم باید به دلیل وجود نرخ عبور (k) عوامل فوق را براساس این نرخ تعیین کنیم. لذا رفتارهای دینامیکی دو مخزن غذایی S و U با وجود نرخ عبور به صورت معادلات ذیل قابل بررسی است:

$dS / dt = - kS \ , \ 0\leq t < T,$ {۱۰}

$dS / dt = - (\mu+k) S \ , \ t \geq T,$ {۱۱}

و

$dU / dt = - kU \ , \ t \geq 0,$ {۱۲}

در این حالت S در کنار φ و نرخ عبور برابر است با :

$S = S_0\times e^{-kt} (1 - \varphi), \quad t \geq T,$ {۱۳}

در صورتی که t برابر با فاز تاخیر (T) گردد، $\varphi=0$ شده و S برابر با $S_0\times e^{-kt}$ خواهد شد. از طرف دیگر قابلیت تجزیه پذیری مواد مغذی براساس نرخ عبور در شکمبه عبارتنداز:

$$Y = [kS_0\int_T^{\infty} \varphi\, e^{-kt}\, dt] / S_0 + U_0 \ , \qquad \{14\}$$

حال براساس جابجایی فرمول های ۱۳ و ۱۴ در معادله ۹ می توان گاز تولیدی در شکمبه را بدست آورد. اما در الگوی *Gompertz* روش پیش بینی گاز تولیدی کمی متفاوت تر خواهد بود. در این معادله μ به روش ذیل محاسبه می شود:

$$\mu = be^{c(t-T)} \quad , \qquad t \geq T, \qquad \{15\}$$

در این معادله پارامترهای b و c (h^{-1}) هر دو ثابت هستند. پارامتر b ارزش اولیه μ است و پارامتر c یک پارامتر توسعه یافته می باشد ($b > 0\ ,\ c \geq 0$). هر چقدر پارمتر c بیشتر شود، نرخ تجزیه پذیری افزایش می یابد. در این الگو φ براساس μ برابر است با:

$$\varphi = 1 - \exp([- b/c]\times[e^{c(t - T)} - 1]), \quad t \geq T, \qquad \{16\}$$

در معادله ۱۶ پارامتر c نمی تواند ارزش منفی داشته باشد. دلیل این امر S است که در زمان بی نهایت به سمت صفر متمایل می شود (لذا، $\varphi(\infty) = 1$). حال براساس جابجایی فرمول ۱۶ با ۹، می توان پیش بینی گاز را در الگوی *Gompertz* انجام داد. همچنین، سایر پارامترهای پیش بینی گاز تولیدی در حالت *In vitro* در جدول ۵-۷ ارائه شده است، که براساس جابجایی با فرمول ۹ قادر به پیش بینی گاز تولیدی می باشند.

جدول ۵-۷ پارامترهای ارائه شده μ و φ در معادلات مختلف ارائه شده برای فرمول ۹.

نام الگو	پارامترها	$\varphi(t)$	$\mu(t)$
Molecullar	$b>0$	$1- e^{-b(t - T)}$	b
France	$b > 0, T \geq 0, c \geq -2b\sqrt{T}$	$1- e^{-[b(t - T) + c(\sqrt{t} - \sqrt{T})]}$	$b + [c / 2\sqrt{t}]$
Logistic	$b, S0 > 0\ , K > S0$	$\frac{1- e^{-bK(t - T)}}{1 + [S_0 / K - S_0]\, e^{-bK(t - T)}}$	$\frac{bK}{1 + [S_0 / K - S_0]\, e^{-bK(t - T)}}$
Morgan	$c, K > 0$	$\frac{(t - T)^c}{(t - T)^c + K^c}$	$\frac{c\,(t - T)^{c-1}}{(t - T)^c + K^c}$

۷-۸-۲ تولید متان براساس الگوهای آماری

پیش بینی متان تولیدی از طریق نوع خوراک مصرفی به دلیل تنوع خوراک بسیار مختلف خواهد بود. به همین دلیل، الگوهای آماری که بیشتر بر پایه نوع خوراک مصرفی بنا می شوند، دارای تنوع معادلاتی فراوانی هستند. این دسته معادلات می توانند برای صنعت دامپروری جهت شناسایی میزان متان تولیدی با حداقل ترین فاکتور ورودی مناسب باشند. بهترین فاکتورهای ورودی جهت شناسایی میزان

متان تولیدی شامل ماده خشک مصرفی، NDF، ADF، تناسب علوفه به کل جیره، انرژی قابل متابولیسم، چربی و پروتئین مصرفی و لیگنین جیره می باشد. رایج ترین معادلات ارائه شده شامل:

- منشاء الگو، دام های گوشتی (تولید متان برحسب(MJ/d)):

CH_4 = 4.38 (±1.46) + 0.0586 (±0.0175) × ME intake (MJ/d)
CH_4 = 3.96 (±1.18) + 0.561 (±0.13) × DMI (kg/d)
CH_4 = 4.79 (±1.98) + 0.0492 (±0.0219) × forage (%)
CH_4 = 5.263 (±1.57) + 6.93 (±2.66) × lignin (kg/d)
CH_4 = 5.58 (±1.12) + 0.848 (±0.266) × NDF (kg/d)
CH_4 = 5.70 (±1.64) + 1.41 (±0.55) × ADF (kg/d)
CH_4 =3.05 (±1.21) + 0.0371 (±0.017) × ME intake (MJ/d) + 0.801 (±0.223) × NDF (kg/d)
CH_4 = 3.31 (±1.27) + 0.0382 (±0.0178) × ME intake (MJ/d) + 1.05 (±0.384) × ADF (kg/d)
CH_4 = 0.357 (±2.04) + 0.0591(±0.0164) × ME intake (MJ/d) + 0.05(±0.0193) × forage (%)
CH_4 = −1.02 (±1.86) + 0.681 (±0.139) × DMI (kg/d) + 0.0481 (±0.0173) × forage (%)
CH_4 = 2.30 (±1.05) + 1.12 (±0.197) × DMI (kg/d) − 6.26 (±2.12) × lignin (kg/d)
CH_4 = 2.70 (±1.38) + 1.16 (±0.271) × DMI (kg/d) − 15.8 (±6.86) × ether extract (kg/d)
CH_4 = 0.183(±1.85) +0.0433(±0.017)×ME intake (MJ/d) + 0.647(±0.244) × NDF (kg/d) + 0.0372 (±0.0186) × forage (%)
CH_4 = 2.94 (±1.16) + 0.0585 (±0.0201) × ME intake (MJ/d) + 1.44 (±0.331) × ADF (kg/d) − 4.16 (±1.93) × lignin (kg/d)

- منشاء الگو، دام شیری (تولید متان برحسب(MJ/d)):

CH_4 = 4.08 (±1.32) + 0.0678 (±0.00905) × ME intake (MJ/d)
CH_4 = 3.23 (±1.12) + 0.809 ±0.0862) × DMI (kg/d)
CH_4 = 8.56 (±2.63) + 0.139 (±0.0563) × forage (%)
CH_4 = 3.14 (±1.88) + 2.11 (±0.407) × NDF (kg/d)
CH_4 = 5.87 (±1.77) + 2.43 (±0.556) × ADF (kg/d)
CH_4 = 1.21(±2.39) +0.0588(±0.0121) × ME intake (MJ/d) + 0.0926 (±0.0366) × forage (%)
CH_4 = 1.64 (±1.56) + 0.396 (±0.017) × ME intake (MJ/d) + 1.45 (±0.521) × NDF (kg/d)
CH_4= 2.16 (±1.62) + 0.493 (±0.192) × DMI (kg/d) −1.36 (±0.631) × ADF (kg/d) + 1.97 (±0.561) × NDF (kg/d)

- منشاء الگو، ترکیبی از دام ها (تولید متان برحسب(MJ/d)):

CH_4 = 4.12 (±0.901) + 0.0657 (±0.00796) × ME intake (MJ/d)
CH_4 = 3.272 (±0.794) + 0.736 (±0.0741) × DMI (kg/d)
CH_4 = 7.27 (±1.1) + 6.49 (±2.07) × lignin (kg/d)
CH_4 = 4.42 (±1.53) + 1.58 (±0.327) × NDF (kg/d)
CH_4 = 1.70(±1.34)+0.0667(±0.00797)×ME intake (MJ/d) + 0.0314 (±0.0128) × forage (%)
CH_4 = 3.44 (±0.937) + 0.502 (±0.115) × DMI (kg/d) + 0.506 (±0.211) × NDF (kg/d)
CH_4 = 3.63 (±0.921) + 0.0549 (±0.00939) × ME intake (MJ/d) + 0.606(±0.306)×ADF (kg/d)
CH_4 = 4.41 (±1.13) +0.0224 (±0.0106) × ME intake (MJ/d) + 0.980 (±0.241) × NDF (kg/d)
CH_4 = 3.69(±0.993)+0.543(±0.132)×DMI(kg/d)+0.698(±0.247)×NDF(kg/d)−3.26(±1.56)× lignin (kg/d)
CH_4 = 3.41 (±0.973) + 0.52(±0.12) × DMI (kg/d) − 0.996 (±0.447) ×ADF (kg/d) +1.15 (± 0.321) × NDF (kg/d)

۳-۸-۷ تولید متان براساس الگوهای تناوبی دینامیکی

این الگوها به هضم مواد مغذی، نرخ عبور، متابولیسم میکروبی و تولیدات ناشی از تخمیر وابسته می باشند. الگوهای تناوبی دینامیکی به دلیل استفاده از عناصر شیمیایی می توانند با صحت بیشتری متان تولیدی را پیش بینی و آن را به همه موجودات تعمیم دهد. بعد از عملیات تجزیه پذیری مواد مغذی و ساخت عناصر مورد نیاز هیدروژن اضافی جهت احیای دی اکسید کربن به متان مصرف می شود. در این شرایط ۶ درصد انرژی خام (GE) جیره مصرفی جهت ساخت متان مصرف می گردد. از آنجا که در مسیر تولیدات تخمیری میزان هیدروژن تولیدی قابل محاسبه است، می توان مقدار تولید متان را تخمین زد. مراحل محاسبه تولید متان از طریق الگوی تناوبی دینامیکی به شرح ذیل است:

۱- محاسبه مقدار هیدروژن تولید شده از تخمیر کربوهیدرات ها جهت تولید اسیدهای چرب فرار (Hy_{Hex}):

Hy_{Hex} (mol/d) = (Ac_{Hex} × 2.0) − (Pr_{Hex} × 1.0) + (Bu_{Hex} × 2.0) − (Vl_{Hex} × 1.0),

در این معادله مقدار تولید استات (Ac_{Hex})، پروپیونات (Pr_{Hex})، بوتیرات (Bu_{Hex}) و والرات (Vl_{Hex}) برحسب (مول بر روز) محاسبه می گردد.

۲- محاسبه مقدار هیدروژن تولید شده از تخمیر اسیدهای آمینه جهت تولید اسیدهای چرب فرار (Hy_{AA}):

Hy_{AA} (mol/d) = (Ac_{AA} × 2.0) − (Pr_{AA} × 1.0) + (Bu_{AA} × 2.0) + (Vl_{AA} × 1.0),

در این معادله مقدار تولید استات (Ac_{AA})، پروپیونات (Pr_{AA})، بوتیرات (Bu_{AA}) و والرات (Vl_{AA}) برحسب (مول بر روز) محاسبه می گردد.

۳- محاسبه مقدار هیدروژن بکار رفته در بیوسنتز اجزای سلول میکروبی (Hy_{MiGr}):

Hy_{MiGr} (mol/d) = ($MiGr_1$ × −0.42) + ($MiGr_2$ × 2.71),

در این معادله $MiGr_1$ و $MiGr_2$ مقدار تولید سلول میکروبی (کیلوگرم بر روز) بدون اسیدآمینه و با اسیدآمینه می باشد. ضریب ۰/۴۲- و ۲/۷۱ مول هیدروژن موجود در هر کیلوگرم میکروب است. البته در تحقیقات دیگری مشخص گردید که برای هر کیلوگرم ماده میکروبی تولید شده از اسیدآمینه ۰/۵۸ مول هیدروژن نیاز است که این عدد برای یک تولید خالص میکروبی محسوب می شود.

٤- محاسبه مقدار هیدروژن بکار رفته در اشباع سازی (بیوهیدروژناسیون) اسید چرب غیر اشباع (Hy_{Fa}):

Hy_{FA} (mol/d) = 1.8 ×$Lipids_{ing}$ ×Hy_{SaFA},

در این معادله $Lipids_{ing}$ مقدار لیپید مصرف شده (مول بر روز)، ضریب ۱/۸ مول اسید چرب بلند زنجیره در هر مول لیپید و Hy_{SaFA} مول هیدروژن بکار رفته جهت یک مول اسید چرب غیر اشباع می باشد.

۵- محاسبه تعادل هیدروژن در شکمبه (Hyrumen):

$$Hy_{rumen}\ (mol/d) = Hy_{Hex} + Hy_{AA} - Hy_{MiGr} - Hy_{FA},$$

٦- محاسبه تولید متان در شکمبه (CH4rumen):

$$CH4_{rumen}\ (mol/d) = Hy_{rumen} / 4.0,$$

در این معادله ضریب ۴/۰، مول هیدروژن لازم جهت ساخت یک مول متان است. نهایتا؛

$$CH4_{rumen}\ (Mcal/d) = CH4_{rumen}\ (mol/d) \times 0.211,$$

ضریب ۰/۲۱۱ در این معادله حرارت مشتعل شده از سوختن یک مگاکالری بر مول متان است.

علاوه بر مراحل فوق معادلات رگرسیونی مانند معادله بلاکستر پیشنهاد شده است که براساس انرژی خام مصرفی و سطح مصرف خوراک میزان تولید متان را پیش بینی می کنند. معادله مزبور عبارتنداز:

$$CH4 = 1.3 + 0.122\ D + L\ (2.37 - 0.05\ D).$$

در این معادله L سطح مصرف خوراک و D انرژی قابل هضم می باشد.

براساس معادلات ارائه شده کارشناسان پیشنهاد کرده اند که ۴۸ درصد هیدروژن تولیدی در شکمبه توسط دی اکسیدکربن تبدیل به متان شده و از محیط خارج می شود. همچنین، ۳۳ درصد هیدروژن در تولید اسیدهای چرب فرار، ۱۲ درصد در ساختمان میکروبی و ۱ تا ۲ درصد هم در بیوهیدروژناسیون اسید چرب مصرف می شود. البته عده ای از محققین براساس معادلات جدیدتر بر این باورند که ۸۰ درصد هیدروژن تولیدی در فرآیند تخمیر صرف ساخت متان شده و از محیط خارج می گردد.

۹-۷ الگوهای ترمودینامیکی در شکمبه

اولین تولیدات حاصل از تخمیر مواد مغذی مانند نشاسته، فیبر و پروتئین ها، قندها و اسیدهای آمینه می باشد که مدت زمان حضور آنها در شکمبه کم و محدود است. این اقلام به سرعت توسط توده میکروارگانیسمی به تولیدات نهایی تخمیر (دی اکسیدکربن، متان، آمونیاک و اسیدهای چرب فرار) تبدیل می شوند. نزدیکی الگوهای تناوبی و دینامیکی به پیش بینی حقیقی تخمیر اسیدهای چرب فرار و گازها نیازمند فهم مناسب از کنترل و مکانیسم های متابولیسم در شکمبه می باشد. این فعالیت های تخمیری که رونمایی از عکس العمل های شیمیایی دوطرفه هستند، توسط الگوهای ترمودینامیکی یا جنبشی کنترل می شوند. البته اگر عکس العمل های شیمیایی تخمیر به تولیدات خودشان محدود شوند، کنترل حرکتی آنها برحسب قانون دوم ترمودینامیک که نیازمند انرژی آزاد می باشد، میسر نخواهد شد.

در این حالت مسیرهای فرعی قانون ترمودینامیک می تواند برای آنها اعمال شود. از طرف دیگر اگر نرخ کاربرد مواد مغذی کنترل کننده مسیر شکل گیری تولیدات باشد، در آن وقت عکس العمل های مربوطه مطلوب قوانین ترمودینامیک خواهد بود و این عکس العمل ها بطور جنبشی کنترل می شوند. این دسته نرخ ها به مقدار مواد مغذی قابل دسترس و یا تراکم آنزیم ها وابسته می باشند.

۱-۹-۷ اصول اولیه ترمودینامیک

قوانین ترمودینامیک اولین بار در قرن هجدهم وارد حوزه زیست شناسی گردید. قانون اول ترمودینامیک بیانگر آن است که انرژی هرگز تولید نمی شود و یا از بین نمی رود، بلکه از حالتی به حالت دیگر تبدیل می شود. براساس قانون اول می توان گفت که انرژی موجود در مدفوع، ادرار، تعریق و تعرق، حرارت بدنی جهت نگهداری بدن، حرارت افزوده بدن، رشد، شیر و تولید مثل مساوی با انرژی مصرف شده توسط خوراک می باشد. لذا قانون اول بیشتر برای چگونگی انرژی موجود در خوراک و سیر آن در کار و تولید دام ها کاربرد دارد. اما قانون دوم ترمودینامیک بر فعالیت های شیمی و فیزیکی تمرکز یافته و نمی توان همه آنها را به صورت مدل های ریاضی در زیست شناسی بخصوص در دام ها بکار برد. براساس این تعریف می توان گفت که در قانون دوم ترمودینامیک چطوری جریان انرژی مدنظر می باشد. قانون دوم بیان کننده آن است که آنتروپی (واحد ترمودینامیک) در طی واکنش های برگشت ناپذیر افزایش یافته و یا بدون تغییر باقی می ماند. همچنین در این نوع واکنش ها مقداری از انرژی بصورت حرارت به محیط مجاور خارج می شود. حالت ریاضی این قانون عبارتنداز:

$$dS_u \geq 0 \qquad [1]$$

تغییر در آنتروپی را می توان به دو بخش سیستم واکنش (dS_{system}) و سیستم مجاور واکنش ($dS_{surroundings}$) تقسیم نمود.

$$dS_u = dS_{system} + dS_{surroundings} \qquad [2]$$

از آنجا که سیستم ناقص بوده و حرارت تولیدی به محیط مجاور وارد می شود، این حرارت کاسته شده از سیستم ($-dH_{system}$) برابر با تغییر آنتروپی و براساس درجه حرارت کلوین بیان می کنند.

$$dS_{surroundings} = - dH_{system} / T \qquad [3]$$

حال براساس جابجایی بین قانون شماره ۲ و ۳ می توان تغییر آنتروپی سیستم واکنش را بصورت ذیل بیان نمود:

$$dS_u = dS_{system} - [dH_{system} / T] \qquad [4]$$

از آنجا که طبق تعریف اولیه، تغییر آنتروپی بایستی برابر یا بیشتر از صفر باشد، می توان فرمول ۱ و ۴ را به شکل ذیل تعریف کرد:

$$0 \leq dS_{system} - [dH_{system} / T] \qquad [5]$$

ضرب (T-) در هر دو طرف فرمول ۵ آن را به شکل ذیل تغییر می دهد:

$$0 \geq dH_{system} - TdS_{system} \qquad [6]$$

این ارزش منفی بدست آمده معرف انرژی آزاد گیبس (ΔG) می باشد. بنابراین ΔG وقتی حرارت واکنش کمتر از سیستم مجاور باشد، منفی می گردد. هر چقدر میزان انرژی گیبس منفی تر شود، سیستم ناکارآمدتر خواهد شد. این عامل اهمیت خود را زمانی نشان می دهد که تخمیر میکروبی در شکمبه براساس حرارت آزاد شده وابسته به ΔG تعیین گردد. انتگرال گیری قانون دوم ترمودینامیک براساس نظریه قانون گازها، روابط ریاضی موجود را بخصوص در زمینه شیمی و زیست شناسی تکمیل تر می کند. در فشار ثابت گاز، تغییرات در انرژی آزاد واکنش ها تابع فعالیت تولیدات ($cC + dD$) و واکنش دهنده ها ($aA + bB$) می باشد:

معادله ۱۸۴-۷:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln (K) \rightarrow K = [products] / [reactants] \text{ or } [C]^c[D]^d / [A]^a[B]^b$$

در این فرمول R ثابت گاز برابر با ۸/۳۱۴ ($J\ ^{\circ}K^{-1}\ mol^{-1}$)، °K درجه حرارت براساس سیستم کلوین، T برابر است با ۲۹۸ درجه کلوین، فاکتورهای a، b، c و d ضرایب عناصر اتمی سازنده و $\Delta G°$ میزان انرژی آزاد شده یک واکنش تحت شرایط استاندارد می باشد. اگر واکنش به سمت توازن دو طرفه حرکت کند، ΔG به سمت صفر تمایل پیدا می کند. در این حالت میزان $\Delta G°$ از مقدار تراکم تولیدات و واکنش دهنده ها تعیین می شود. براساس $\Delta G°$ می توان یک ثابت توازن برای واکنش های انجام شده طراحی نمود که عبارتنداز:

$$K_{eq} = e^{-\Delta G°/RT} \qquad [7]$$

بنابراین در الگوی ترمودینامیک می توان برای هر یک از اجزا یا ملکول های واکنش نرخ تغییر در واحد زمان براساس معادله ۱۸۴-۷ و فرمول ۷ طراحی نمود. همچنین، این دسته اصول ارائه می تواند برای واکنش های اکسیدردوکتاز با الکترون (e^-) و پروتون (H^+) معاوضه شده که بطور عموم در شکمبه رخ می دهد کاربرد داشته باشد:

$$Ox + ne^- + cH^+ \longleftrightarrow b\ Red$$

در این واکنش (Ox) اکسید و (Red) ردوکتاز بوده و n هم تعداد الکترون جابجا شده در نیمه واکنش می باشد. همچنین، معادله نرست (nerst) که برای محاسبه پتانسیل ردوکس (E, volt) استفاده می شود از واکنش فوق الگو گرفته شده است:

معادله ۱۸۵-۷:

$$E = E^{\circ} + [RT / nF] \ln([Ox]^a [H^+]^c / [Red]^b) \rightarrow$$

$$E = E^{\circ}_{pH} + [RT / nF] \ln([Ox]^a / [Red]^b)$$

با

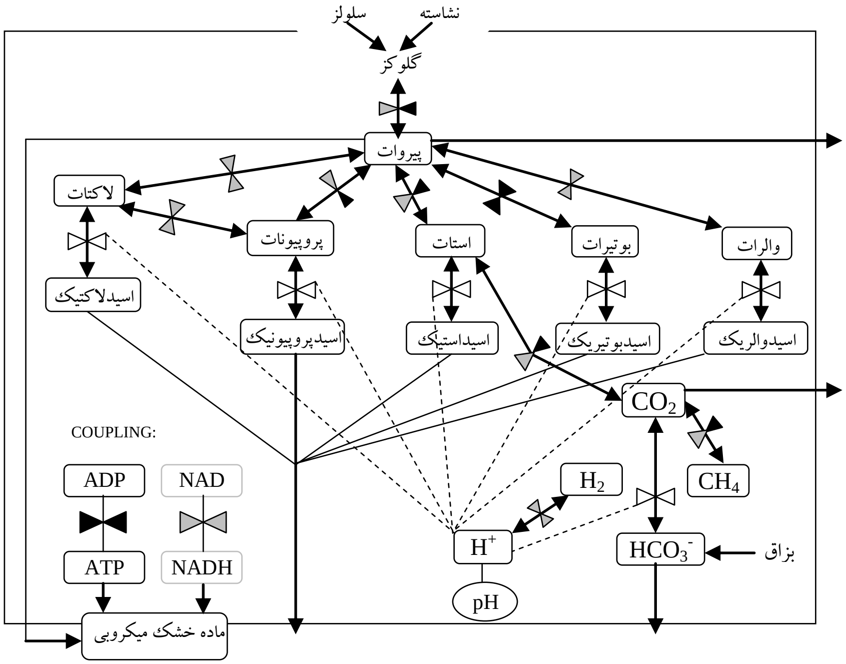
$$E'^{\circ}_{pH} = E^{\circ} + c \times [RT / nF] \ln(10) \times pH$$

در الگوی فوق F ثابت فارادی($۹/۶۴۸۷ \times ۱۰^{۴}$)، استاندارد پتانسیل ردوکس در نیمه واکنش (E°) [T=298K, pH=0]، و استاندارد پتانسیل ردوکس برای یک اسیدیته (E'°_{pH}) منظور شده است. برای به تعادل رسیدن الکترون ها، نیمه دوم واکنش باید جفت گردد. لذا الکترون ها از جفت احیا کننده (E_{red}) به جفت اکسید کننده (E_{ox}) جابجا می شوند. برای هر نمونه واکنشی تغییرات انرژی گیبس (ΔG) متناسب با تغییرات پتانسیل ردوکس (ΔE) است:

$$\Delta G = -nF\,(E_{ox} - E_{red}) = -nF\,\Delta E$$

۲-۹-۷ الگوی تخمیری شکمبه در مسیر ترمودینامیک

الگوی تخمیر شکمبه ایی براساس ۲۳ بخش قابل تخمیر پایه ریزی شده است که به ملکول های بزرگ بیوشیمی و دیگر بخش های موجود در ماده خشک میکروبی وابسته است (شکل ۲۶-۷). در این الگو مایعات بر مبنای $mol.L^{-1}$ ، گازها بر مبنای اتمسفر و ماده خشک میکروبی بر مبنای $g.L^{-1}$ در نظر گرفته شده است. هر کدام از این بخش ها دارای یک معادله دیفرانسیل دینامیکی هستند که براساس تفاوت ورودی و خروجی تعریف می شوند.



شکل ۲۶-۷ الگوی ترمودینامیکی ساده شده Fo براساس مسیرهای تخمیری در شکمبه.

واکنش های موجود در الگوی Fo برگشت پذیر و دارای قانون ترمودینامیکی ذیل با ثابت K_{eq} می باشد:

$aA + bB \leftarrow {}^{k_1, k_2} \rightarrow cC + dD$

k_1 = نرخ ثابت برای بازگشت واکنش است

k_2 = نرخ ثابت برای انجام واکنش است

نرخ (r) در این واکنش می تواند بدین صورت تعریف گردد:

$r(t) = (-1/a) \times (d[A] / dt) = (-1/b) \times (d[B] / dt) = (-1/c) \times (d[C] / dt) = (-1/d) \times (d[D] / dt)$

همچنین نرخ مزبور می تواند براساس واکنش فوق بدین صورت بازنویسی گردد:

$r(t) = k_1 [A]^a [B]^b - k_2 [C]^c [D]^d$

حال، براساس ثابت فرمول ۷ و فرمول فوق می توان ثابت واکنش (K_{eq}) را زمانی که $r(t)$ برابر با صفر شود، بدست آورد:

$K_{eq} = k_1 / k_2$

۱-۲-۹-۷ ناظم بخش های تخمیری شکمبه در الگوی ترمودینامیک Fo

یکی از شناخته ترین مثال های ترمودینامیکی جهت کنترل متابولیسم شکمبه تنظیم اسیدیته توسط یون بیکربنات و پروتون های هیدروژن می باشد. سیستم بیکربنات دارای دو شکل بزرگ یونی HCO_3^- و CO_3^{2-} می باشد. یون HCO_3^- نخستین بافر با اهمیت در سیستم تخمیر است که می تواند با پروتون گیری به اسیدکربنیک تبدیل شود. یون مزبور می تواند از بزاق و یا دیواره شکمبه نیز آزاد گردد.

$pH_{rumen} = 7/74 + Log([HCO_3^-] / [pCO_2])$

همچنین، دومین عامل موثر بر اسیدیته شکمبه در الگوی Fo یون هیدروژن است که بر اثر اکسید و احیا در واکنش اکسیدردوکتاز ذیل به هیدروژن تبدیل می شود: $NADH + H^+ \longleftrightarrow NAD^+ + H_2$

در حالات بسته، موازنه دینامیک برای واکنش های تعادلی فوق از طریق $\Delta G = \Delta E = 0$ بدست می آید. اما در حالات باز، واکنش تعادلی هرگز دیده نمی شود $\Delta E \neq 0$. لذا این گونه واکنش ها و روابط بین آنها در حالت باز دیده نخواهد شد. به هر حال، پتانسیل ردوکس برای شکمبه (E_{mean}) در حالت بسته بوسیله توزین میانگین پتانسیل ردوکس در هر جفت اکسیدردوکتاز (E_i) تعریف می شود. واکنش های تخمیری فراوانی در شکمبه هستند که وابسته به اکسیداسیون – ردوکتاز می باشند. هر جفت مربوطه را می توان توسط پتانسیل ردوکس توصیف نمود. جدول ۶-۷ پتانسیل ردوکس نیمه واکنش های اصلی موجود در شکمبه را نشان می دهد. پتانسیل ردوکس در شکمبه به طور میانگین ۳۵- ولت می باشد. این حالت ترمودینامیکی مطلوب پیروات، لاکتات و تجمع هیدروژن (H_2) نمی باشد.

در ادامه، سومین عامل موثر بر اسیدیته شکمبه موازنه بین آنیون های تشکیل شده و اسید وابسته به آن می باشد. اسیدیته می تواند بواسطه ثابت تعادل بر روی واکنش های تخمیری اثر خود را ایجاد نماید.

$A^- + H^+ \longleftrightarrow AH$

جدول ۶-۷ پتانسیل ردوکس در اسیدیته صفر و هفت در درجه حرارت ۳۱۱ درجه کلوین.

$[Ox]^a/[Red]^b$ for E = -35 V	E'° (volt)	E° (volt)	موازنه
۶/۹۸ × ۱۰$^{-۳۴}$	−۰/۰۰۹	+۰/۴۹۵	(۲ پیروات)$^{-۱}$ + ۷H^+ + ۶e^- ⟷ CO_2 + ۲H_2O + (**والرات**)$^{-۱}$
۲/۳۴ × ۱۰$^{-۱۱}$	−۰/۰۲۲	+۰/۴۱۰	(لاکتات)$^{-۱}$ + ۲H^+ + ۲e^- ⟷ ۲ H_2O + (**پروپیونات**)$^{-۱}$
۱/۹۳ × ۱۰$^{-۱۵}$	−۰/۱۲۳	+۰/۳۰۹	(پیروات)$^{-۱}$ + ۴H^+ + ۴e^- ⟷ ۲ H_2O + (**پروپیونات**)$^{-۱}$
۸/۲۵ × ۱۰$^{-۵}$	−۰/۲۲۴	+۰/۲۰۸	(پیروات)$^{-۱}$ + ۲H^+ + ۲e^- ⟷ (**لاکتات**)$^{-۱}$
۵/۷۳ × ۱۰$^{-۱۱}$	−۰/۲۷۱	+۰/۱۶۱	CO_2 + ۸H^+ + ۸e^- ⟷ ۲H_2O + (**متان**)
۹/۵۷ × ۱۰$^{-۵}$	−۰/۳۱۹	+۰/۰۵۹	۲CO_2 + ۷H^+ + ۸e^- ⟷ ۲H_2O + (**استات**)$^{-۱}$
۷/۴۲ × ۱۰$^{-۱}$	−۰/۳۴۶	−۰/۱۳۰	NAD^+ + H^+ + ۲e^- ⟷ **NADH**
۴/۵۵ × ۱۰$^{+۲}$	−۰/۴۳۲	۰۰/۰۰۰	۲H^+ + ۲e^- ⟷ $\mathbf{H_2}$
۷/۲۸ × ۱۰$^{+۱۱}$	−۰/۷۱۶	−۰/۲۸۴	(**استات**)$^{-۱}$ + CO_2 + ۲H^+ + ۲e^- ⟷ ۲ H_2O + (پیروات)$^{-۱}$
۲/۹۸ × ۱۰$^{+۲۵}$	−۰/۷۴۳	−۰/۰۹۵	(**۲ پیروات**)$^{-۱}$ + ۶H^+ + ۴e^- ⟷ (گلوکز)

۲-۲-۹-۷ تولید متان و کاهش استات در الگوی ترمودینامیک Fo

دومین کاربرد قانون دوم ترمودینامیک در الگوی Fo امکان پیش بینی تولید متان و سنتز استات از دی اکسیدکربن و هیدروژن است. یکی از راه های دفع هیدروژن اضافی در شکمبه تولید متان توسط میکروب های متان زا می باشد. البته اگر هیدروژن اضافی بتواند با دی اکسیدکربن ترکیب و استات بسازد، می تواند از هدر روی انرژی موجود در شکمبه جلوگیری نماید. واکنش تولید متان و استات از هیدروژن به شرح ذیل می باشد:

$$CO_2\,(aq) + 4\,NADH + 4\,H_2 + (ADP + Pi^{-2}) \leftrightarrow CH_4 + 3\,H_2O + 4\,NAD^+ + ATP$$

$$2\,CO_2(aq) + 4NADH + 3H^+ + 0.25(ADP + Pi^{-2}) \leftrightarrow C_2H_3O_2^- + 0.25ATP + 2.25H_2O + 4NAD^+$$

فشار گاز در شکمبه تقریبا یک اتمسفر معادل ۱۰^{۵} × ۱/۰۱۳۲۵ پاسکال می باشد که ۷۰ درصد این فشار را فشار دی اکسیدکربن تشکیل می دهد. تراکم هیدروژن موجود در شکمبه را می تواند از معادله نرست توسط پتانسیل احیا و اسیدیته محاسبه نمود:

معادله ۱۸۶-۷:

$$\Delta E = \Delta E^\circ + [RT / (nF) \text{ times}] \ln([H^+]^2 / [H_2]_g)$$

محلولیت $[H_2]_g$ در معادله فوق برابر با تراکم هیدروژن در نیمه دوم واکنش تعادلی NAD^+ می باشد. خصوصیت حالت های شکمبه توسط اصول ترمودینامیکی بررسی و بطور استاندارد شامل ولت E = −۰/۳۱۵ و pH = ۶/۵ می باشد.

$$\Delta G^\circ = \Sigma\Delta G^\circ_f\,[products] - \Sigma\Delta G^\circ_f\,[reactants]$$

بنابراین با شرایط استاندارد، $[H_2]_g$ برابر با $1/6 \times 10^{3}$ اتمسفر معادل ۱۶۲ پاسکال می شود. با توجه به تراکم هیدروژن بدست آمده می توان متان تولیدی را محاسبه نمود. بطور مثال؛ در شرایط استاندارد و با مقدار $[H_2]_g$ بدست آمده میزان متان تولیدی محاسبه شده ۰/۳ اتمسفر می باشد. جدول ۷-۷ اطلاعات ترمودینامیکی را تحت حالت استاندارد برای واکنش ها و تولیدات بعلاوه سایر متابولیت های شکمبه نشان می دهد. این مقادیر، تغییرات انرژی آزاد ($\Delta G_f°$) و آنتالپی ($\Delta H_f°$) شکل گرفته در متابولیت ها و عناصر سازنده آن مانند هیدروژن و اکسیژن را بررسی می نماید. امروزه می توان $\Delta G°$ را از طریق فهرست تهیه شده برای هر واکنش ثبت شده در شکمبه و تولیدات مشخص آن بدست آورد.

جدول ۷-۷ استاندارد $\Delta G_f°$ و $\Delta H_f°$ در متابولیت های شکمبه با ۲۹۸/۱۵° کلوین، $pH = 0$ و شرایط یک اتمسفر.

متابولیت ها	$\Delta G_f°$	$\Delta H_f°$	متابولیت ها	$\Delta G_f°$	$\Delta H_f°$
آلفا، بتا، دی-گلوکز (آبدار)	-۹۱۶/۱۷	-۱۲۶۴	پروپیونات (آبدار)	-۳۷۳/۸۲	-۵۰۷
استات (آبدار)	-۳۷۶/۸۹	-۴۸۶	لاکتات (آبدار)	-۵۱۶/۷۲	-۶۸۷
استواستات (آبدار)	-۴۹۳/۷۰	-	مالات (آبدار)	-۸۴۵/۱۰	-۸۴۳
آکریلات (آبدار)	-۲۸۶/۲۰	-۳۸۳	متان (گاز)	-۵۰/۷۹۰	-۷۴
آمونیوم (آبدار)	-۷۹/۵۰۰	-۱۳۳	نیترات (آبدار)	-۱۱۰/۵۰	-۲۰۷
بوتیرات (آبدار)	-۳۷۲/۰۴	-۵۳۶	آب (لیتر)	-۲۳۷/۱۹	-۲۸۶
دی اکسیدکربن (گاز)	-۳۸۶/۲۳	-۴۱۳	اگزالواستات (آبدار)	-۷۹۷/۲۰	-۷۹۳
کروتونات (آبدار)	-۲۷۵/۷۰	-۰۸۳	پیروات (آبدار)	-۴۷۴/۶۰	-۵۹۶
فومارات (آبدار)	-۶۵۱/۰۰	-۷۷۷	سوکسینات (آبدار)	-۷۴۴/۰۰	-۹۰۹
سولفید هیدروژن (گاز)	-۲۷/۸۷۰	-۰۲۰	سولفات (آبدار)	-۷۴۲/۰۰	-۹۰۷
بتاهیدروکسی بوتیرات (آبدار)	-۵۰۶/۳۰	-	پروتون ها (آبدار)	۰	۰
ADP^{-3}	-۱۷۱۱	-۲۰۰۵	NAD^{-}	۰	۰
ATP^{-4}	-۲۵۷۳	-۲۹۹۸	$NADH^{-2}$	+۲۲	-۳۱

البته جهت اصلاح سازی $\Delta G_f°$ بر پایه حرارت می توان از معادله ون هاف که براساس تغییرات آنتالپی و درجه حرارت ابتدایی (T_1) و پایانی (T_2) بوجود آمده استفاده و $\Delta G°$ را برهمین رویه ارائه نمود:

$$\Delta G°_{T2} = T_2 / T_1 [\Delta G°_{T1} - \Delta H° (T_2 - T_1) / T_2]$$

نتایج $\Delta G°$ از $\Delta G_f°$ براساس معادله تغییر یافته ون هاف، تحت حالت استاندارد و در درجه حرارت ۳۱۱ درجه کلوین محاسبه شده و در جدول ۸-۷ ارائه گردیده است.

جدول ۸–۷ تفاوت انرژی ارزیابی شده از پروسه های احیای شکمبه ایی بدون بررسی تغییرات ATP.

پروسه احیا	پذیرنده(mM)	$\Delta G°$(kj)	ΔG(kj)	$\Delta G°$(kj/2H)
$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2O$	۰/۰۱۶	–۷۱/۶	–۸/۸۰	–۲/۲۰
$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	۰/۰۱۶	–۱۳۴	–۶۷/۴	–۱۶/۹
$SO_4^{2-} + H^+ + 4H_2 \rightarrow HS^- + 4H_2O$	۰/۰۷۰	–۲۳۴	–۸۴/۴	–۲۱/۱
$NO_2^- + 2H^+ + 3H_2 \rightarrow NH_4^+ + 2H_2O$	۸/۰۰۰	–۵۱۹	–۳۷۱	–۱۲۴
$NO_3^- + H_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O$	۱۵/۰۰	–۱۶۱	–۱۳۰	–۱۳۰
(پیروات)$^{-1}$ + H_2 → (لاکتات)$^{-1}$	۱۰$^{-۶}$	–۳۹/۸	–۵/۲۰	–۵/۲۰
استیل کوآنزیم آ + H_2 → بتا هیدروکسی بوتیریل کوانزیم آ	۱۰$^{-۶}$	–۳۴/۱	–۱۷/۴	–۱۷/۴
(اگزالواستات)$^{-2}$ + H_2 → (مالات)$^{-2}$	۱۰$^{-۶}$	–۴۷/۸	–۳۱/۱	–۳۱/۱
کروتونیل کوآنزیم آ + H_2 → بوتیریل کوانزیم آ	۱۰$^{-۶}$	–۸۰/۷	–۶۴/۰	–۶۴/۰
(آکریلات)$^{-1}$ + H_2 → (پروپیونات)$^{-1}$	۱۰$^{-۶}$	–۹۴/۳	–۵۱/۳	–۵۱/۳
(فومارات)$^{-2}$ + H_2 → (سوکسینات)$^{-2}$	۱۰$^{-۶}$	–۸۴/۰	–۶۳/۶	–۶۳/۶

هیدروژن (H_2) نیازی به انتقال دهنده الکترون در پروسه ها مزبور ندارد؛ اما نهایتا متابولیک یون هیدروژن (H^+) با هیدروژن (H_2) در توازن بوده و توسط گونه های میکروبی در واکنش ها انتقال می یابد. حالات استاندارد بکار رفته شامل: { ۱۰$^{-۳}$ × ۱/۶ اتمسفر = [H_2] } ، {pH = ۶/۵ } ، { ۵۰ میلی مول = [H_2O]} ، {۱۰$^{-۶}$ × ۴ مول = $^{-۲}$(سوکسینات) } و {۱۰$^{-۶}$ مول = $^{-۲}$ (مالات) = (بتا هیدروکسی بوتیریل کوانزیم آ) = (بوتیریل کوانزیم آ) }، {۷۰ میلی مول = $^{-۱}$ (استات) } ، {۲۵ میلی مول = $^{-۱}$(پروپیونات) } ،{۱۵ میلی مول = $^{-۱}$(بوتیرات) } ، {۱ میلی مول = $^{-۱}$(لاکتات) } ، {۰/۱۴ میلی مول =$^{-۱}$(HS) } و {۱۱ میلی مول =$^{+۱}$(NH_4) } می باشد.

این محاسبات برای کل واکنش های مهم در الگوی متابولیسمی Fo قابل بررسی می باشد. برای محاسبه اطلاعات داده شده در جدول مزبور می توان از معادله ۱۸۴–۷ و تصحیحات معادله ون هاف برای تغییرات انرژی آزاد گیبس استفاده نمود. بطور مثال؛ روند محاسبات انجام شده برای تولید متان و استات شامل:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln ([CH_4]_{aq}[H_2O]^2 / [CO_2]_{aq}[H_2]^4{}_g)$$

ΔG = –۱۳۴ + ۰/۰۰۸۳۱۴ × ۳۱۱ × لگاریتم ([۶ × ۱۰$^{-۶}$] × [۵۰]^{۲} / [۰/۰۱۶] × [۱/۶ × ۱۰$^{-۳}$]^{۴})

ΔG = –۶۷/۴ کیلوژول بر مول

در حل این معادله نشان داده شده است که ΔG منفی می شود. بنابراین، انجام این واکنش در شکمبه امکان پذیر می باشد. بر همین رویه معادله تولید استات را تشکیل و امکان پذیر بودن این واکنش در شکمبه را محاسبه می کنیم:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln ([C_3H_3O_3^-][H^+][H_2O]^2 / [CO2]^2aq[H_2]^4{}_g)$$

ΔG = –۷۲/۲ + ۰/۰۰۸۳۱۴ × ۳۱۱ × لگاریتم ([۰/۰۵۰] × [۱ × ۱۰$^{-۶/۵}$] × [۵۰]^{۲} / [۰/۰۱۶] × [۱/۶ × ۱۰$^{-۳}$]^{۴})

ΔG = –۸/۸۰ کیلوژول بر مول

این واکنش همانند واکنش قبلی امکان پذیر است. اما باید ذکر کرد که تولید ATP در این واکنش ها و محاسبات آنها وارد نشده است. براساس همین رویه می توان معادلات سایر واکنش های موجود در شکمبه را محاسبه و امکان پذیر بودن آن را در شکمبه بررسی نمود.

۷-۹-۲-۳ جمعیت میکروبی در الگوی ترمودینامیک Fo

مقدار ماده میکروبی خشک موجود در شکمبه بوسیله جریان های وابسته به رشد، خرد شدن میکروارگانیسمی و انتقال آن تنظیم می شود. جریان های مربوط به رشد و خرد شدن میکروب ها تابع مقدار ماده خشک میکروبی بوده و بر پایه نرخ رشد میکروبی محاسبه می شود. نرخ رشد و خرد شدن میکروب ها به نرخ انرژی (ATP/ADP) در شکمبه وابسته است. رشد به عنوان یک تابع تناوبی مثبت از x وقتیکه ($x = k \times [(ATP / ADP) -1]$) باشد، تعریف می گردد. این تعریف این اجازه را می دهد که وقتی انرژی دارای واحد مثبت باشد باز رشد میکروبی اتفاق افتد. در مقابل، تعریف خرد شدن میکروب ها برعکس رشد آنها بوده و به عنوان یک تابع تناوبی منفی از x می باشد. جریان انتقال هم براساس قانون واکنش توده انجام گرفته و ادامه می یابد.

میکروب ها برای رشد نیاز به ATP و NADH دارند که توسط مسیرهای بیوشیمیایی موجود در شکمبه بدست آمده و مقدار وابستگی میکروب ها به این فاکتورها به مقدار ماده خشک میکروبی دارد. کربن مورد نیاز میکروب ها از پیروات حاصل شده تامین می شود که با تغییر ورودی و خروجی پیروات میزان رشد میکروبی تغییر می یابد. میزان کربن موجود در ماده خشکی میکروبی تقریبا ۲۵ درصد فرض می شود.

۷-۹-۳ کارآیی الگوی ترمودینامیک در شکمبه

کارآیی هر ماده خوراکی مانند سنتز گلوکز می تواند از تراکم واکنش دهنده ها و تولیدات آنها محاسبه شود. تعیین این نوع کارآیی به طور صحیح و اصولی تنها از مسیر ترمودینامیکی قابل بررسی می باشد. کارآیی بعضی از واکنش دهنده ها و تولیدات آنها در شکمبه توسط قوانین ترمودینامیک در جدول ۹-۷ ارائه شده است. کارآیی ترمودینامیکی بیانگر حداکثر میزان تولید از واکنش دهنده ها در شکمبه می باشد. کارآیی ترمودینامیک بیش از یک در شکمبه امکان پذیر نمی باشد و بنابراین تحت حالت های شکمبه تشکیل استات از دی اکسیدکربن در شکمبه رخ نخواهد داد.

براساس همین کارآیی ترمودینامیکی کارشناسان متوجه شدند که ساخت متان در مقایسه با ساخت اسیدهای چرب فرار بیشتر و راحتر انجام می گیرد. لذا صرف انرژی در این مسیر نسبت به سایر مسیرهای شیمیایی یا بیوشیمیایی بیشتر خواهد بود. مسیر تشکیل متان با مسیر ساخت اسیدهای چرب فرار مشابه می باشد، بنابراین ما نباید در هنگام ردیابی انرژی متعجب شویم که کاهش انرژی آزاد کمتر از مقدار واقعی

است که به خارج از آن حمل می شود. میزان تولیدات موجود در شکمبه براساس میزان حرارت ایجاد شده در طی تخمیر و طبق قوانین ترمودینامیک کنترل می گردد. البته لازم به ذکر است که تاثیر اسیدیته در نوع تولیدات بی اثر نبوده و نمونه آن را می توان در اسیدهای چرب فرار جستجو کرد. اسیدیته با هماهنگی قوانین ترمودینامیک اقدام به سنتز اسید لاکتیک می نماید. با ازدیاد قندهای محلول و بالطبع افزایش اسیدیته به دلیل انباشته شدن اسیدهای چرب فرار، ساخته شدن اسید لاکتیک با کارآیی بیشتر، تسریع می یابد.

جدول ۹-۷ انرژی آزاد واکنش دهنده ها در شکمبه (کیلوژول بر مول) تحت حالات مختلف.

واکنش ها	تعداد ATP	ΔG_{Rxn}	ΔG_{ATP}	ΔG_{Total}	$-\Delta G_{ATP} / \Delta G_{Rxn}$
گلوکز به استات	۴	-۳۱۷/۷	۱۷۷/۵	-۱۴۰/۲	۰/۵۵۹
گلوکز به پروپیونات	۴	-۳۲۱/۸	۱۷۷/۵	-۱۴۴/۳	۰/۵۵۲
گلوکز به بوتیرات	۳	-۳۱۲/۰	۱۳۳/۱	-۱۷۸/۹	۰/۴۲۷
گلوکز به لاکتات	۲	-۲۰۶/۱	۸۸/۸۰	-۱۱۷/۳	۰/۴۳۱
تولید متان از هیدروژن	۱	-۶۷/۹۰	۴۴/۴۰	-۲۳/۵۰	۰/۶۵۳
تولید استات از CO_2	۰/۲	-۸/۷۰۰	۸/۹۰۰	+۰/۱۰۰	۱/۰۱۵
ADP به ATP	۱	+۴۴/۴۰	-	-	-

حالت شکمبه جهت محاسبه اعداد جدول شامل: { ۰/۳ اتمسفر = $[CH_4]$ } ، { ۰/۷ اتمسفر = $[CO_2]$ } ، { pH = ۶/۵} ، { ۰/۰۰۱۵۲ اتمسفر = $[H_2]$ } ، {۵۰ میلی مول = $[H_2O]$} ، {۰/۱ میلی مول بر لیتر = گلوکز } و {۳۰ میلی مول بر لیتر = بوتیرات = پروپیونات } ، {۸۰ میلی مول بر لیتر = استات } ، {۱ میلی مول بر لیتر = لاکتات } ، {۱ میلی مول بر لیتر = ATP } و {۰/۰۰۲ میلی مول بر لیتر = [ADP][Pi] } می باشد.

بعد از محاسبه کارآیی تغییرات انرژی آزاد بکار رفته در تراکم متابولیت های خاص، می توان یک الگوی دینامیکی براساس حداکثر شدن کارآیی های بالقوه طراحی و آن را توسعه داد. کارآیی واقعی از کارآیی بالقوه پایین تر بوده مگر آنکه واکنش دهنده ها توسط ترمودینامیک محدود شوند. تغییرات انرژی آزاد (ΔG) در مبانی حداکثر شدن کارآیی به آستانه تغییرات انرژی آزاد (ΔG_T) تبدیل و تعریف می گردد (معادله ۱۸۷-۸). آستانه انرژی آزاد (سر حد انرژی آزاد) برابر با مقدار کاهش غیر قابل دسترس در انرژی آزاد می باشد، که از بازنویسی معادله ۱۸۴-۷ بوجود می آید.

معادله ۱۸۷-۷:

$$\Delta G_T = \Delta G^{\circ} + RT \ln([products]_T / [reactants]_T)$$

وقتی کارآیی ΔG در یک واکنش به آستانه نزدیک می شود، نرخ واکنش رفت و برگشت در آن تقریبا برابر خواهد بود.

$$k_{rxn} [reactants] = k_{-rxn} [products]$$

از الحاق معادله ۱۸۷-۷ با رابط فوق می توان یک نرخی را که با ثابت واکنش در واکنش دهنده ها برابر است، اثبات نمود.

$$k_{rxn} / k_{-rxn} = e^{(\Delta G° - \Delta G°T) / RT}$$

از طریق نرخ مزبور برای هر واکنش و کارآیی های بدست آمده می توان ΔG_T مربوطه را محاسبه نمود.

۴-۹-۷ تغییر نسبت اسیدهای چرب فرار در الگوی ترمودینامیک

همانطور که در الگوی Fo مشخص شده است، پیروات براساس واکنش های مختلف به اسیدهای چرب فرار به خصوص استات، پروپیونات و بوتیرات تبدیل می شود که به دلیل منفی بودن ΔG واکنش ها این روند بسیار سریع و آنی صورت می گیرد. عده ای از کارشناسان معتقدند تغییرات انرژی آزادی (ΔG)که سبب تغییر پیروات به یکی از اسیدهای چرب فرار می شود با تغییرات انرژی آزادی (ΔG_i) که سبب تغییر نسبت های اسید چرب فرار می شود، برابر خواهد بود. اگر این فرضیه صحیح باشد، می بایست همان قوانین ترمودینامیکی که سبب تعادل در تولید اسیدهای چرب فرار شده است در تغییرات نسبت های آنها هم صادق باشد. تغییر انرژی آزاد محاسبه شده از تغییر استات به پروپیونات و استات به بوتیرات در جدول ۱۰-۷ ارائه شده است. نوع اسید چرب جهت این محاسبه بصورت تصادفی و شرایط شکمبه به حالت استاندارد انتخاب شده است.

جدول ۱۰-۷ محاسبه ΔG تغییر درونی اسیدهای چرب فرار از استات به پروپیونات و از استات به بوتیرات.

نوع جیره	A[2] mM	P[3] mM	B[4] mM	H_2 Pa	CH_4 Pa[5]	CO_2 Pa[6]	pH	$\Delta G_{A\to P}$ KJ[7]	$\Delta G_{A\to B}$ KJ[8]
علوفه فراوان	۷۰	۲۰	۱۲	۱۶۲	۳۳/۴۳۷	۶۷/۸۸۸	۶/۵	-۱۱/۲	۴/۲
مواد متراکم فراوان	۶۰	۴۹	۲۴	۲۶۳	۲۵/۳۳۱	۷۵/۹۹۴	۵/۴	-۱۲/۵	-۲/۸

{بوتیرات = [B]} ، {پروپیونات= [P]} ، { استات = [A]}

$\{[CO_2] = (M/Pa)\ ۲/۲۶ \times ۱۰^{-۷} \times P_{CO2}\}$ ، $\{[CH_4] = (M/Pa)\ ۱/۹۷ \times ۱۰^{-۱۰} \times P_{CH4}\}$

$\{\Delta G_{A\to P} = \Delta G°_{A\to P} + RT \ln([P][H_2O]^2 / [A][CO_2][H_2]^3)\}$

$\{\Delta G_{A\to B} = \Delta G°_{A\to B} + RT \ln([B][H_2O]^2 / [A]^2[H^+][H_2]^2)\}$

تغییر نسبت اسیدهای چرب فرار اولین بار در سیستم آزمایشگاهی (*in vivo*) مورد بررسی قرار گرفت. در این حالت نسبت خاصی از اسیدهای چرب فرار و یا یک اسید خاص در شکمبه بصورت پیوسته و یا تک دوز تزریق گردید. پس از تزریق نرخ تولید اسیدهای چرب فرار محاسبه شد. محاسبه نرخ تولید بین فعالیت های ثانویه و اولیه مخزن اسیدهای چرب فرار به کارشناسان این اجازه را داد تا بتوانند نسبتی از نرخ تولید خام را که مشابه تولید اولیه نبوده و ترجیحا از تفاوت اسیدهای چرب فرار

تولید شده سرچشمه گرفته است، را محاسبه کنند. نرخ تولید خام می تواند پشتوانه تغییر درونی اسیدهای چرب فرار بوده و نرخ تولید خالص را تصحیح نماید. از آنجا که در طی این تغییر درونی مقداری از انرژی به صورت ATP خارج می شود، لازم است اثر آنها در معادلات منظور گردد. اما به دلیل قطعی نبودن میزان تولیدات ATP در مسیرهای شیمیایی استفاده از ضریب تصحیح آن در معادلات با شک و شبه همراه بوده است. بطور مثال؛ در تبدیل استات به پروپیونات گزارشات متفاوتی از میزان تولید ATP ارائه شده است که می تواند ناشی از نوع آزمایش انجام شده در درون سلول و یا درون مایع مخزن تخمیر باشد. امروزه مباحث عناصر اتمی سازنده ATP در تصحیح این معادلات مورد توجه قرار گرفته است.

جهت برقرار کردن توازن بین اسیدهای چرب فرار می بایست تغییر نسبت های مابین آنها بوسیله عناصر سازنده تصحیح تا واکنش های رفت و برگشت در درون محیط یکسان گردد. بطور مثال؛ تغییر استات به پروپیونات در تراکم بالای استات و اسیدیته ثابت، چهار برابر سریعتر از واکنش برگشت پذیری آن می باشد (وقتی سیستم خارج از حالت موازنه گردد). لذا، در شرایط ترمودینامیکی این سرعت واکنش باید تصحیح تا موازنه واقعی بین واکنش های رفت و برگشت برقرار گردد. برای تعیین سرعت واکنش رفت و برگشت در موازنه های تغییر درونی می توان نرخ تغییر درونی روندهای معکوس مابین اسیدهای چرب فرار را همراه با تراکم واکنش دهنده ها، تولیدات، فشار ارزیابی شده برای ثابت واکنش ها و انرژی قابل دسترس برای تولید ATP بکار برد. بطور مثال؛ در تغییر استات به پروپیونات سرعت واکنش برابر است با:

$$CH_3COO^- + CO_2 + 3H_2 + n\ ADP + nP_i \longleftrightarrow CH_3CH_2COO^- + (2 + n)\ H_2O + nATP$$

$$V_{A\rightarrow P} = -d\ [CH_3COO^-] / dt = K_{A\rightarrow P}\ ([CH_3COO^-]\ [CO_2])\ (P_{H2}{}^3)\ ([ADP][Pi][H_+])^n$$

$$V_{P\rightarrow A} = -d\ [CH_3CH_2COO^-] / dt = K_{P\rightarrow A}\ ([CH_3CH_2COO^-]\ [H_2O])^2\ ([ATP][H_2O])^n$$

در این معادلات V سرعت واکنش رفت یا برگشت، K نرخ ثابت فعالیت جنبشی و n تعداد مول ATP تولیدی (و یا مصرف شده اگر منفی باشد) در نظر گرفته شده است. همچنین نرخ تغییر درونی روندهای معکوس مابین اسیدهای چرب فرار (R) در استات و پروپیونات برابر است با:

$$R = V_{A\rightarrow P} / V_{P\rightarrow A}$$

$K_{A\rightarrow P} / K_{P\rightarrow A} = K_{eq} \quad \rightarrow \quad R = K_{eq} \times Q$ یا $K_{eq} = R / Q$

در اینجا Q نرخ فشارهای واکنش دهنده به تولیدات و تراکم تصحیح شده آنها براساس ضرایب عناصر اتمی تعریف می شود. حال اگر فرض شود که نسبت مساوی از انرژی آزاد استات و پروپیونات

برای تولید ATP صرف شده است، ΔG برای تغییر درونی در حالت توازن صفر خواهد بود (در این شرایط $R = 1$ و $Q = Keq^{-1}$). لذا:

$\Delta G° = - RT \ln (K_{eq})$ (فرمول شماره ۷ در الگوی ترمودینامیک را ببینید)

این $\Delta G°$ تغییر درونی واکنش جفت شده را برای سنتز ATP نشان می دهد. همچنین می توان $\Delta G°$ را برای واکنش جفت نشده ($\Delta G°_{rxn}$) و برای سنتز ATP $\Delta G°_{rxn + ATP} = \Delta G°_{rxn} + n\ \Delta G°_{ATP}$ ($\Delta G°_{ATP}$) تقسیم نمود:

تفاوت مابین $\Delta G°$ محاسبه شده از راه آزمایش روندها و تراکم ها ($\Delta G°_{rxn + ATP}$) و $\Delta G°$ محاسبه شده از ΔG_f واکنش ها و تولیدات بدون بررسی تغییرات ATP را ($\Delta G°_{rxn}$) می نامند. و در حد کمتر، $\Delta G°$ محاسبه شده از تغییرات انرژی آزاد ATP کاربردی و یا تولید شده را $n\ \Delta G°_{ATP}$ می نامند ($n\ \Delta G°_{ATP} = \Delta G°_{rxn + ATP} - \Delta G°_{rxn}$). اجزای سازنده ATP کاربردی و یا تولیدی (n) می توانند بوسیله تقسیم ($n\ \Delta G°_{ATP}$) بر یک $\Delta G°_{ATP}$ (که تحت حالت فیزیولوژیکی با اسیدیته ۶/۵ برای سنتز ATP محاسبه می شود) محاسبه شود.

۷-۱۰ برای مطالعه بیشتر

- افضل زاده، ا.، سیف دواتی، ج. (۱۳۸۱). احتیاجات انرژی و پروتئین در نشخوارکنندگان. ترجمه. چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران.
- افضل زاده، ا.، پورعابدین، م.، خادم، ع. (۱۳۸۹). اثر سطوح مختلف تغذیه بر فاز تاخیر، ضریب انباشتگی، پتانسیل عبور و پتانسیل تجزیه برخی مواد علوفه ای مورد استفاده در تغذیه نشخوارکنندگان. چهارمین کنگره علوم دامی کشور. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی. صفحه ۱۸۱۱.
- افضل زاده، ا.، پورعابدین، م.، خادم، ع. (۱۳۸۹). اثر سطوح مختلف تغذیه بر فراسنجه های تجزیه پذیری ماده خشک برخی مواد علوفه ای و کنسانتره ای مورد استفاده در تغذیه دام. چهارمین کنگره علوم دامی کشور. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی. صفحه ۱۶۴۲.
- شریفی، م.، خادم، ع. ا.، افضل زاده، ا. (۱۳۸۷). اثر سیلو و علوفه خشک یونجه بر رفتار مصرف خوراک، فراسنجه های شکمبه و تولید شیر در گاوهای شیرده هلشتاین. سومین کنگره علوم دامی کشور. دانشگاه فردوسی مشهد. صفحه ۱-۳.

- Afzalzadeh, A., B. D. Hovell. (2002). Comparison of omasal and bomasal stimulation by VFA and hypertonic solution. Proceeding of the British Society of Animal Science. U.K. Scareborough.

- Allen, M. S., D. R. Meretens. (1988). Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. American Institute of Nutrition.
- Argyle, J. L., R. L. Baldwin. (1988). Modeling of rumen water kinetics and effects of rumen pH changes. J. Dairy Sci. 71: 1178-1188.
- Bazin. M. J., P. T. Saunders., J. I. Prosser. (1976). Models of microbial interactions in the soil. Critical Reviews in Microbiology. 4: 463-498.
- Baldwin, R. L. (1995). Modeling ruminant digestion and metabolism. Chapman & Hall, London, united Kingdom.
- Bannink, A., J. Dijkstra, E. Kebreab, J. France. (2006). Nutrient digestion and utilization in farm animals: Modelling approaches. CAB International, Wallingford, United Kingdom, ISBN-13: 978 1 84593 005 9.
- Bannink, A., H. D. E Visser. (1997). Comparison of mechanistic rumen models on mathematical formulation of extra microbial and microbial processes. J Dairy Sci 80:1296–1314.
- Bannink, A., H. De Visser, A.M. Van Vuuren. (1997) a. Comparison and evaluation of mechanistic rumen models. British Journal of Nutrition 78, 563-581.
- Bannink, A. (2007). Modelling volatile fatty acid dynamics and rumen function in lactating cows. Thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Benchaar, C., J. Rivest, C. Pomar, J. Chiquette. (1998). Prediction of methane production from dairy cows using existing mechanistic models and regression equations. J Anim Sci. 76:617-627.
- Broderic, G. A., R. J. Wallace, E. R.Ørskov. (1991). Control of rate and extent of protein degradation. In: Physiological aspects of digestion and Metabolism in Ruminants (Editors: Tsuda T, Sasaki Y and Kawashima R). Academic Press, Orlando, FL, pp541-592.
- Broderick, G. A., M. K. Murray. (1992). Rumen protein degradation rates estimated by non-linear regression analysis of Michaelis-Menten in vitro data. British Journal of Nutrition, 67: 27-42.
- Chang, R. (1981). The Second Law of Thermodynamics. In: Physical Chemistry with Applications to Biological Systems, 2nd ed. pp. 129-163. New York: Macmillan.
- Chilibroste, P., J. Dijkstra, S. Tammiga. (2001). Design and evaluation of a non steady state rumen model. Netherlands Journal of Agriculture Science, 49:297-312.
- Czerkawski, J. W. (1986). An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford.

- Danfær. A. (1990). A Dynamic model of nutrient digestion and metabolism in lactating dairy cows. PhD Dissertation. National Institute of Animal Science, Foulum, Denmark.
- Dhanoa, M. S., J. France, R. C. Siddons. (1995). A non-linear compartmental model to describe forage degradation kinetics during incubation in polyester bags in the rumen. British Journal of Nutrition. 73: 3-15.
- Dijkstra. J., A. Bannink. (2000). Analyses of modelling whole rumen function. In Feeding Systems and Feed Evaluation Models, chapter 13, pp. 299-322 (M.K. Theodorou and J. France), editors. Wallingford: CAB International.
- Dijkstra. J., J. France. (1995). Modelling and methodology in animal science. In Proceedings Fourth International Workshop on Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals, pp. 9-18 (A. Danfaer and P. Lescoat, editors). Foulum, Denmark: National Institute Animal Science.
- Dijkstra, J., H. D Neal, D. E. Beever, J. France. (1992). Simulation of nutrient digestion, absorption, and outflow in the rumen: Model description. Journal of Nutrition 122: 2239-2256.
- Dijkstra, J., J. A. Mills., J. France. (2002). The role of dynamic modelling in understanding the microbial contribution to rumen function. Nutrition Research Reviews. 15: 67-90.
- Dijkstra, J., W. J. Gerrits, A. Bannink, J. France. (2000). Modelling Lipid Metabolism in the Rumen. Book, CAB International. Printed in the Netherlands.
- Ellis, J. L., E. Kebreab, N. E. Odongo, B. W. McBride, E. K. Okine, J. France. (2007). Prediction of methane production from dairy and beef cattle. J. Dairy Sci. 90:3456–3467.
- Ehle, F. R., F. Bas, B. Barnd, and R. Martin. (1984). Particulate rumen turnover rate measurement as influenced by density of passage marker. J. Dairy Sci. 67:2910–2913.
- France. J. (2008). Mathematical modelling in animal nutrition. Wallingford: CAB International. ISBN: 9781845933548.
- France, J., J. Dijkstra, M. S. Dhanoa, S. Lopez, A. Bannink, (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. Br. J. Nutr. 83, 131–142.
- France, J., J. Dijkstra, M. S. Dhanoa, S. Lopez, A. Bannink. (2005). A general compartmental model for interpreting gas production profiles. Animal Feed Science and Technology 123–124: 473–485

- Firkins, J. L., M. S. Allen, B. S. Oldick, N. R. Stpierre. (1998). Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. J Dairy Sci 81:3350–3369.
- Firkins, J. L. (1996). Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. American Institute Journal of Nutrition. 1347s-1354s.
- Girard, V. (1990). Effect of rate of intake on ruminal rate of passage of small forage particles. Can. J. Anim. Sci. 70: 243–250.
- Harvatine, K. J., S. A. Michael. (2005). Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. American Society of Nutrition. 677- 685.
- Hoh, C. (1996). Modeling of reaction kinetics in anaerobic ecosystems with considerations of thermodynamic principles. Thesis. Murdoch University, Australia.
- Hooper, A. P., Welch, J. G. (1985). Effects of particle size and forage composition on functional specific gravity. Dairy Sci. 68: 1181-1188.
- Hristov, A. N., S. Ahvenjarvi, T. A. McAllister, P. Huhtanen. (2003). Composition and digestive tract retention time of ruminal particles with functional specific gravity greater or less than 1.02. J Anim Sci: 81:2639-2648.
- Huang, H. (2002). Fermentation control and modeling with application in production of thermostable alpha amylase using recombinant bacillus subtilis. Thesis. College of Engineering and Technology of Ohio University.
- Jayawardena, V. P. (2000). Observations on the ruminal protein degredation products and the absorbtion of ruminally derived free and peptide bound amino acids via ovine forestomach epithelia in vitro. Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Jenkins, T. C. (1994). Regulation of lipid metabolism in the Rumen. American Institute Journal of Nutrition. 1372s-1376s.
- Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the Rumen. J Dairy Sci 76:3851-3863.
- Jou, D., J. E. Llebot. (1990). Introduction to the thermodynamics of biological processes. Englewood Cliffs: Prentice Hall.
- Kebreab, E., J. Dijkstra, A. Bannink, J. France. (2009). Recent advances in modeling nutrient utilization in ruminants. J Anim Sci.87:E111-E122.
- Krishna, U. M., C. J. Sniffen, M. D. Stern, P. J. Van Soest. (1983). Evaluation of a mathematical model of rumen digestion and an in vitro simulation of rumen proteolysis to estimate the rumen-undegraded nitrogen content of feedstuffs. British Journal of Nutrition, 50: 555-568.

- Khadem, A. A., M. Sharifi, A. Afzalzadeh, M. Rezaeian. (2009). Effects of alfalfa hay or barley flour mixed alfalfa silage contained diets on feeding behavior, productivity, rumen fermentation and blood metabolites of lactating cows. Japanese Animal Science. Volume 80, page: 403-410.
- Lirette, A., L. P. Milligan. (1989). A quantitative model of reticulo-rumen particle degradation and passage. British Journal of Nutrition. 62: 465-419.
- Lescoat. P., D. Sauvant. (1995). Development of a mechanistic model for rumen digestion validated using the duodenal flow of amino acids. Reproduction Nutrition Development 35, 45-70.
- López, S., F. D. D. Hovell, J. Dijkstra, J. France. (2003). Effects of volatile fatty acid supply on their absorption and on water kinetics in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. J Anim Sci. 81:2609-2616.
- Makkar, H. P.S., C. S. McSweeny. (2005). Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants. Published by Springer. ISBN-13 978-1-4020-3791-7 (e-book).
- Mertens, D. R. (1993). Rate and extent of digestion. Pages 13–51 in Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. J. M. Forbes and J. France, ed. CAB Int., Wallingford, United Kingdom.
- Meretens, D. R. (1973). Application of theoretical mathematical models to cell wall digestion and forage intake in ruminants. Ph.D. thesis, Cornell Univ., Ithaca, NY.
- Mertens, D. R. (1976). Principles of modeling and simulation in teaching and research. Journal of Dairy Science Vol. 60, No. 7.
- Michalet-Doreau, B. M. Y. Ould-Bah. (1993). In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in rumen: A review. Animal Feed Science and Technology 40: 57-86.
- Mills, J. A., J. Dijkstra, A. Bannink, S. B. Cammell, E. Kebreab, J. France. (2001). A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: model development, evaluation, and application. J Anim Sci. 79:1584-1597.
- Murphy, M. R., R. L. Baldwin, M. J. Ulyatt. (1986). An update of a dynamic model of ruminant digestion. J Anim Sci. 62:1412-1422.
- Offner, A., D. Sauvant. (2006). Thermodynamic modeling of ruminal fermentations. Anim. Res. 55 (2006) 343–365.
- Oldick, B. S., J. L. Firkins, R. A. Kohn. (2000). Compartmental modeling with nitrogen-15 to determine effects of degree of fat saturation on intraruminal N recycling. J Anim Sci. 78:2421-2430.

- Pourabedin, M., A. Afzalzadeh, A. A. Khadem. (2009). Influence of feeding level on effective rumen degradability of alfalfa hay and maize silage. Krmiva. Croatia. Zagreb. Vol: 3 pp: 145-152.
- Ørskov. E. R., I. McDonald. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. Journal of Agricultural Sciences (Cambridge) 92: 499-505.
- Quiroz, R. A., K. R. Pond, E. A. Tolley, W. L. Johnson. (1988). Selection among nonlinear models for rate of passage studies in ruminants. J Anim Sci. 66:2977-2986.
- Reichl, J. R., R. L. Baldwin. (1993). A rumen linear programming model for evaluation of concepts of rumen microbial function. J. Dairy Sci. Vol 59. Nom 3.
- Russell, J. B., J. D. O’Connort, D. G. Fox, P. J. Van Soestt, C. J. Sniffentvz. (1992) A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. ruminal fermentation. J. Anim. Sci. 70:3551-3561.
- Schwab, C. G., T. P. Tylutki, R. S. Ordway, C. Sheaffer, M. D. Stern. (2003). characterization of proteins in feeds. J. Dairy Sci. 86: (E. Suppl.): E88–E103.
- Schettini, M. A., E. C. Prigge, E. L. Nestor. (1999). Influence of mass and volume of ruminal contents on voluntary intake and digesta passage of a forage diet in steers. J Anim Sci. 77:1896-1904.
- Seo, S., C. Lanzas, L. O. Tedeschi, A. N. Pell, D. G. Fox. (2009). Development of a mechanistic model to represent the dynamics of particle flow out of the rumen and to predict rate of passage of forage particles in dairy cattle. J. Dairy Sci. 92:3981–4000.
- Singh, N. (2005). A model to predict fluctuations in rumen pH. Thesis. University of Maryland, College Park.
- Sveinbjörnsson, J. (2006). Substrate Levels, carbohydrate degradation rate and their effects on ruminal end-product formation. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. ISBN 91-576-7075-7.
- Thornley, J. H. M., J., France, (2005). Mathematical models in agriculture, 2nd ed. CABI Publishing, Wallingford,UK, p. 850.
- Van Milgen, J., M. R. Murphy, L. L. Berger. (1991). A Compartmental Model to Analyze Ruminal Digestion. J Dairy Sci 742515-2529.
- Van Soest, P. J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca.

- Van Soest P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. (1991). Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3590.
- Wolin. M. J. (1979). The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems. In Advances in Microbial Ecology 3, pp. 49-77 (M Alexander, editor). New York: Plenum Press.

فصل هشتم

دستکاری فعالیت های زیستی در شکمبه

۸-۱ تاریخچه دستکاری فعالیت های زیستی در شکمبه	۳۸۳
۸-۲ تغییر روند شیمیایی تخمیر در دستکاری های شکمبه ای	۳۸۴
۸-۳ اثر خوراک مصرفی بر دستکاری های شکمبه ای	۳۹۱
۸-۴ دستکاری شکمبه براساس عوامل حیوانی	۴۲۷
۸-۵ دستکاری های ژنتیکی	۴۳۰
۸-۶ تغییر تولید متان در دستکاری های میکروبی	۴۳۴
۸-۷ برای مطالعه بیشتر	۴۳۸

دستکاری فعالیت های زیستی در شکمبه

در بخش های پیشین جمعیت های میکروارگانیسمی و تنوع فعالیت های زیستی بر روی مواد مغذی به خصوص عناصر اصلی کربوهیدارت، پروتئین، چربی و عناصر جزء آنها مورد بحث قرار گرفت. در این بخش تلاش می گردد که تاثیر مواد مغذی و سایر عناصر را بر تغییر هدفمند جمعیت میکروارگانیسم ها جهت کنترل تولیدات خاص نهایی تخمیر اشاره نماییم. تغییر هدفمند سبب بروز تولیدات از پیش تعیین شده، افزایش جمعیت میکروبی (پروتئین میکروبی) و کارایی بیشتر مواد غذایی می شود. دستکاری فعالیت های زیستی در شکمبه همواره در تغییر اسیدهای چرب فرار شکمبه (بخصوص نسبت های اسید استیک و پروپیونیک)، کاهش تلفات انرژی (بیشتر از طریق کاهش متان تولیدی)، کنترل پروتئین میکروبی و عبوری (براساس کاهش تخریب اسیدهای آمینه مصرفی و افزایش مصرف نیتروژن غیر پروتئینه برای سنتز پروتئین باکتریایی)، تنظیمات دی اکسیدکربن، هیدروژن و آمونیاک انباشته شده در شکمبه ایفای نقش نموده است. دریافت بیشتر انرژی و پروتئین توسط دام به دلیل گران بودن خوراک از مسائل مهم تنظیمات جیره محسوب می گردد. از آنجا که جیره نویسان در تعیین کیفیت مواد غذایی مصرفی و ترکیب صحیح آنها با یکدیگر در رسیدن به بیشترین حد جذب مواد مغذی تلاش می کنند، چگونگی ایجاد تغییرات زیستی میکروارگانیسم ها و پایدار نمودن آن در شکمبه برای این ردیف از علم جایگاه خاصی پیدا کرده است. کارشناسان تغذیه همواره در تحقیق هستند تا بتوانند موادی را وارد جیره غذایی نموده، و یا ترکیبی از خوراک ارائه دهند، که سهم بیشتری از انرژی و پروتئین خوراک مصرفی در اختیار دام قرار گیرد. البته در این راستا محققین از علم ژنتیک (مهندسی زیست پایه) به سبب ایجاد سرعت بیشتر تغییرات در فعالیت زیستی شکمبه استفاده شایانی کرده اند.

۸–۱ تاریخچه دستکاری فعالیت های زیستی در شکمبه

اگر چه دستکاری فعالیت های زیستی گوارشی از زمان آشنایی انسان با جیره نویسی به طور نیمه آگاهانه یا ناآگاهانه در دام و طیور بکار گرفته شده است، اما اصول دستکاری های زیستی به روش علمی از اواسط قرن بیستم آغاز و توسعه یافت. دستکاری های فعالیت های زیستی شکمبه در ابتدا با تغییرات ظاهری چربی شیر و تولید گوشت مورد ارزیابی قرار می گرفت. اما امروزه با ورود علم ژنتیک و بررسی توانایی های دام در تولید گوشت یا شیر، دستکاری های زیستی بر اساس تغییر توده زنده میکروبی در شکمبه پا به عرصه گذاشته و برپایه حداکثری شدن انرژی و پروتئین جذبی توسط دام، کنترل عوامل زیست محیطی اطراف دام همراه با ایجاد پایداری در شکمبه فعالیت می نماید. امروزه اکثر تحقیقات در بخش دستکاری های زیستی به سه بخش عمده تغییر روندهای شیمیایی تخمیر، ورود گونه

های جدید میکروبی و تغییر الگوی مصرف (برمبنای چگونگی خوراک دهی، کمیت و کیفیت خوراک مصرفی) تقسیم می گردد.

با اندیشه های فوق می توان تعریف جدیدی درباره دستکاری فعالیت های زیستی شکمبه ارائه کرد که به معنای افزایش تولید شیر یا گوشت به تنهایی نباشد. بلکه حد بهینه مصرف، ثبات محیط زیست شکمبه و کنترل شرایط متغیر بیرون دام را شامل گردد. تعریف امروزی دستکاری فعالیت زیستی در مخزن تخمیر شامل بهینه سازی روند تخمیر در شکمبه با ایجاد رابط های معین، ثابت و کارآمدی است، که به اتفاق کارشناسان قابل پیگیری، الگونویسی و محصولات از پیش تعیین شده باشد. بطور مثال؛ کاهش تولید متان در گاوهای گوشتی از طریق دستکاری سبب ازدیاد پروپیونات در شکمبه گاوهای گوشتی می شود. البته افزایش پروپیونات در گاوهای شیری صفت زیاد مطلوبی محسوب نشده و لازم است اسید استیک افزایش یابد.

۸-۱-۱ تعریف دستکاری فعالیت های زیستی

دستکاری شکمبه به دو شکل بیان می شود. (۱)- از لحاظ اکولوژیکی شکمبه؛ عبارتنداز هر عملی که منجر به تغییر اکولوژیکی محیط شکمبه از لحاظ تعداد گونه های میکروبی شود را دستکاری شکمبه گویند. این شیوه از سال های پیشتر صورت می گرفته و بحث جدیدی محسوب نمی شود. (۲)- از لحاظ بیوشیمیایی؛ شامل هر عملیاتی که منجر به تغییر فرآورده های پایانی تخمیر گردد. تعریف دوم می تواند دستکاری از لحاظ اکولوژیکی را در بر گرفته و در این تعریف باید هضم آنزیمی، اضافه کردن مواد و محرک های شیمیایی را هم مدنظر قرار داد. تعریف دستکاری شکمبه از لحاظ اکولوژیکی را می توان در قالب تغییراتی که در جیره حیوان قرار می دهیم (مانند تغییر نسبت جیره از ۴۰ : ۶۰ علوفه به مواد متراکم به ۳۰ : ۷۰)، بسادگی مشاهده نمود. تا مدتی دستکاری به تعریف دوم با چالش استفاده از مواد شیمیایی و محدودیت های علمی- عملی و قانونی آن روبرو بود، که امروز با تولید مواد میانجی و بدون اثر در تولیدات دامی مشکل مربوطه حل گردید.

۸-۲ تغییر روند شیمیایی تخمیر در دستکاری های شکمبه ای

تخمیر شکمبه ای براساس سه خصوصیت ویژه (۱) میزان ماده آلی تخمیر شده، (۲) تراکم و نسبت تولیدات تخمیری تشکیل یافته و (۳) مقدار و کارآیی پروتئین میکروبی سنتز شده مورد بررسی قرار می گیرد. انرژی آزاد شده از مواد آلی بر اثر تخمیر بی هوازی شکمبه بیشتر درون اسیدهای چرب فرار و اندکی در گرمای آزاد شده و متان جای می گیرد. مقداری از ترکیبات آلی تخمیر شده درون ساختار سلول میکروب ها جای گرفته که بخشی از آن به عنوان پروتئین میکروبی مورد استفاده قرار می گیرد. با

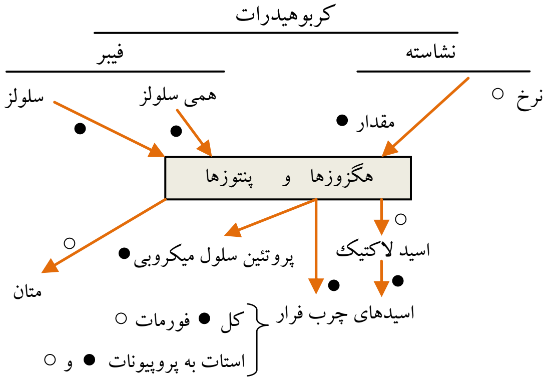
تغییر روند تخمیر می توان محل قرار گیری ماده آلی تخمیر شده را براساس نیاز تولیدی تعیین نمود. می توان براساس تغییر فعالیت های شیمیایی و متابولیسمی میکروبی توسط عامل های شیمیایی کارآیی خوراک مصرفی را بیشتر نمود. مهمترین عامل مذکور در تغییر یک فرآیند شیمیایی کنترل نرخ ورود و خروج مواد مغذی، اسیدیته، اکسیداسیون – احیاء و فشار اسمزی می باشد. البته درباره اثر عامل های مذکور توضیحاتی مبسوط در فصول گذشته ارائه شده است. برای تعیین کارآیی دستکاری زیستی براساس تغییر روند شیمیایی کارشناسان در تحقیقات خود از دو راه حل عمومی (۱) بررسی انرژی کاهش یافته خوراک و انرژی تجمعی در تولیدات و (۲) میزان اسیدهای آمینه میکروبی تولید شده و میزان پروتئین حقیقی عبور یافته استفاده می کنند. اما جهت صحت بیشتر نتایج محققین استفاده از روش آنزیم شناسی میکروبی و تراکم کلیدهای ژنتیکی میکروبی را لازم می دانند.

۸–۲–۱ دستکاری براساس تغییر روند تخمیر کربوهیدرات

تغییر روند تخمیر قندها در شکمبه همواره بر اصل تغییر نوع ماده غذایی و سپس کنترل عامل های هدایت کننده تخمیر مانند اسیدیته صورت گرفته است. لذا ترکیب جیره اساسی ترین عامل در تغییر تنوع میکروبی شکمبه بیان می گردد. از آنجا که بیشترین ترکیب ماده غذایی مشاهده شده در جیره نشخوارکنندگان کربوهیدرات بخصوص پلی ساکاریدها بیان می شود. پس بیشترین اثر را در مقایسه با سایر مواد مغذی بر تنوع میکروبی خواهند داشت. پلی ساکاریدها دارای یک ساختار شیمیایی گسترده و متنوعی هستند که قابلیت هضم و تخمیر متفاوتی از خود بروز می دهند. پلی ساکاریدهای ذخیره ای بخصوص سلولز، همی سلولز و پکتین همراه با نوع غیر ذخیره ای آن مانند نشاسته و فروکتوزان ها منبع اصلی انرژی (بیش از ۷۰ درصد) برای دام ها به شمار می آیند.

براساس نوع تولید دام مانند شیر، گوشت و یا تلفیقی از هر دو می توان کربوهیدرات خاصی را مورد استفاده قرار داد. پلی ساکاریدهای ذخیره ای سازنده چربی شیر و نوع غیر ذخیره ای آن برای افزایش گوشت مناسب می باشند. صرفه نظر از نوع ساختار و عملیات، پلی ساکاریدها نهایتا به هگزوز و پنتوز تبدیل شده و به سرعت از طریق روندهای تخمیری به پیروات و سپس اسیدهای آلی تبدیل می شوند. در طی فرآیند مذکور هیدروژن تولید و از طریق دی اکسیدکربن تولید متان را رقم خواهد زد. با مصرف کربوهیدرات ذخیره ای مانند سلولز به دلیل کاهش در نرخ عبور و اسیدیته، تخمیر منجر به تولید متان و اسید استیک می شود (نسبت استات به پروپیونات ۲۰ : ۷۰ می باشد). پایداری این روند سبب چرخش تنوع میکروبی از باکتری های آمیلولایتیکی به سلولایتیکی و متان ساز و افزایش جمعیت باکتریایی می گردد (شکل ۱–۸). این در حالی است که با تغییر نسبت علوفه به مواد متراکم (کاهش) تولید متان و

اسید استیک کاهش یافته و اسید پروپیونیک افزایش می یابد (نسبت استات به پروپیونات ۴۰ : ۵۰ می باشد). لذا توده زنده میکروبی به سمت آمیلولایتیکی تمایل یافته و با ازدیاد آنها همراه با مصرف بالای مواد متراکم تولید اسید لاکتیک (تجمع لاکتات به صورت طبیعی اتفاق نمی افتد) فراوان می شود. افزایش اسید لاکتیک باعث افزایش اسیدیته مخزن تخمیر شده و در صورت ادامه یافتن این روند تنوع زیستی گونه های میکروبی از ۱۰^{۷} به ۱۰^{۳} میکروارگانیسم در هر میلی لیتر مایع شکمبه کاهش و در نهایت حذف می شود. لذا با تغییر در نوع کربوهیدرات مصرفی می توان گونه میکروبی شکمبه را تغییر و به سمت مورد نظر سوق داد. البته نوع ساختار کربوهیدراتی موجود در زیر گروه های یکسان گیاهی هم می تواند بر تنوع میکروبی شکمبه اثر مستقیم داشته باشد. بدین شکل که تغییر کیفیت ساختمانی کربوهیدرات مصرفی از جو به ذرت (در گروه مواد پر تراکم) سبب ازدیاد باکتری های سلولایتیک و کاهش باکتری های آمیلولایتیک خواهد شد (به دلیل تخمیر آهسته تر نشاسته ذرت در مقایسه با جو).



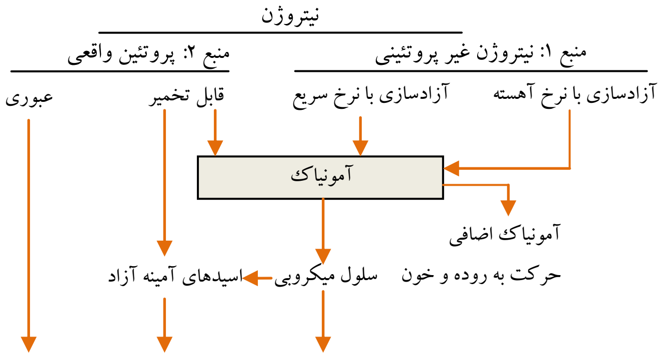
شکل ۱-۸ نمونه ای از الگوی دستکاری در تخمیر کربوهیدرات (افزایش ● و کاهش ○ در نقاطی با بیشترین احتمال تغییر نشان داده شده است).

اسیدیته شکمبه که یک عامل هدایتگر در تنظیمات تخمیری به حساب می آید، به شدت تابع تجمع اسیدهای چرب فرار بخصوص اسید پروپیونیک و اسید لاکتیک است. از طرفی اسیدیته مهمترین عامل در ایجاد جوامع مختلف میکروبی به شمار می آید. لذا اسیدهای چرب فرار با کنترل اسیدیته شکمبه و سایر عوامل محیطی تخمیر وابسته به اسیدیته مانند نرخ عبور تنوع میکروبی و گسترش جمعیت های آنها را کنترل می نماید. حال براساس الگوی ارائه شده می توان گفت سیر هدفمند کربوهیدرات مصرفی از حالت های ساختاری به غیرساختاری و بالعکس در کنار سایر مواد مغذی (به شکل تعادلی) می تواند الگوی ترکیبی جمعیت میکروارگانیسم ها را به شکل مطلوب (بدون عوارض زیست محیطی) و بسیار کم هزینه تر از سایر موارد تغییر دهد.

۸-۲-۲ دستکاری براساس تغییر روند تخمیر نیتروژن

پروتئین به دلیل گران بودن، منبع غذایی بسیار مهمی در جیره نشخوارکنندگان محسوب می گردد. به حداقل رساندن تخریب پروتئین های واقعی بخصوص اسیدهای آمینه خاص مصرف شده، به حداکثر رساندن مصرف مواد غیر پروتئینی جهت ساخت پروتئین میکروبی و کاهش فعالیت پروتوزوئرها که مصرف کننده پروتئین میکروبی و پایداری آن در شکمبه می باشند، از مهمترین مسائل دستکاری فعالیت های زیستی شکمبه بشمار می آید. از طرف دیگر؛ افزایش سطح تماس میکروارگانیسم ها با مواد غیر پروتئینی، افزایش ضریب بکارگیری این مواد در ساخت سلول میکروبی و متعادل نمودن نسبت انرژی به پروتئین مصرفی جزء کارهای مهم دستکاری فعالیت های زیستی در شکمبه عنوان می شود. برای کنترل تغییر روند تخمیر نیتروژن در دستکاری فعالیت های زیستی لازم است مقدار نیتروژن ورودی (پروتئین واقعی و غیر واقعی) و خروجی را همراه با تعادل اسیدهای آمینه ساخته شده ثبت و میزان تغییر آن را بررسی نمود. روند تغییر تخمیر نیتروژن طبق نظریه نولان بر اصل تغییر خوراک پروتئینی، فرآوری ماده غذایی و سپس عامل های هدایت کننده انجام می گیرد.

نیتروژن فراهم شده در مخزن تخمیر شکمبه دام ها می تواند از راه های مختلفی وارد جریان تخمیر گردد. راههای ورودی براساس شرایط محیطی تخمیر مانند نرخ عبور، اسیدیته، نوع نیتروژن مصرفی، تعادل سایر مواد مغذی بویژه انرژی و تراکم نیتروژن ورودی قابل تغییر می باشد. الگوی ارائه شده جهت تغییر تخمیر نیتروژن در شکل ۲-۸ ارائه شده است. از آنجا که آمونیاک علاوه بر ماده حدواسط تخمیر میکروبی تاثیر بالایی بر شرایط محیطی تخمیر و ساخت پروتئین میکروبی دارد، لازم است در تغییر روند تخمیر نیتروژن همواره مورد کنترل و بازبینی قرار گیرد. افزایش آمونیاک ناشی از کسر انرژی و یا ازدیاد مصرف مواد نیتروژنی غیر پروتئینی می تواند مسیر تخمیر پروتئین را متوقف نماید. از طرفی کاهش شدید آمونیاک هم سبب کاهش توده زنده میکروبی و تغییر مسیر تخمیر می گردد. از آنجا که ۶۰ تا ۹۰ درصد پروتئین مصرفی در شکمبه تجزیه و تخمیر می شود، برای عبوری کردن پروتئین بخصوص اسیدهای آمینه جهت دستکاری روند تخمیر نیتروژن می توان از روشهای شیمیایی (کپسوله کردن، ترکیب با تانن ها و غیره) و فیزیکی (پختن، آسیاب کردن و غیره) استفاده نمود. با تغییر نوع نیتروژن مصرفی می توان نوع باکتری های فعال شکمبه را تغییر داد. بطور مثال؛ تغییر نیتروژن جیره از پروتئین واقعی به اوره سبب کاهش باکتری های استرپتوکوکوس بوویس و لاچنوسپیرا و افزایش باکتری مگاسفرا السدنی می شود. البته در این بین باکتری هایی مانند سلنوموناس رومینانتیوم هستند که تغییر چندانی در صورت وجود انرژی کافی و عادت پذیری مناسب نمی کنند.



شکل ۲-۸ الگوی دستکاری در تخمیر نیتروژن. تغییر در هر منبع خوراکی (با ۲ زیر مجموعه در هر یک) می تواند مسیر تخمیر را براساس انرژی در دسترس تغییر و تنوع میکروبی را دستخوش تغییر قرار دهند.

در هنگام استفاده از ترکیباتی مانند اوره با نرخ سریع در آزادسازی آمونیاک لازم است جهت ایجاد تنوع میکروبی، انرژی کافی در اختیار میکروارگانیسم های مخزن تخمیر قرار گیرد. هر چقدر نرخ آزادسازی آمونیاک آهسته تر باشد تعادل در تنوع میکروب های شکمبه بیشتر مشاهده خواهد شد. اگر چه فعالیت های پروتئولایتیکی (پروتئاز خارج سلولی) بوسیله باکتری های گرم مثبت امکان پذیر است، اما آزمایشات نشان می دهد که این فعالیت در باکتری های گرم منفی گسترده تر و مهم تر خواهد بود. باکتری های گرم مثبت در تراکم های بالای پروتئین مصرفی فعالیت پروتئازی از خود نشان می دهند. پس می توان در هنگام مصرف پروتئین حقیقی تمامی فعالیت دستکاری روند تخمیر را در جهت توقف باکتری های گرم منفی بکار برد.

۳-۲-۸ دستکاری براساس تغییر روند تخمیر چربی ها

تاثیر چربی بر روند تخمیر به اشباع و غیراشباع بودن آنها و میزان مصرف در جیره وابسته می باشد. اسیدهای چرب غیراشباع می توانند توسط میکروارگانیسم ها شکسته و یا هیدروژنه شوند. این روند با کاهش هیدروژن اضافی در شکمبه همراه و باعث بهبودی روند تخمیر و جمعیت میکروارگانیسم ها می گردد. البته مصرف بیش از حد چربی در جیره (بالای ۸-۵ درصد ماده خشک) سبب کاهش فعالیت تخمیری میکروب ها و کاهش جمعیت آنها می شود. مثلا افزایش ۱۲ درصدی چربی در جیره فعالیت پروتوزوئرها را به دلیل کاهش نرخ اتصال آنها به مواد مغذی شدیدا کاهش می دهد. تغییر روند تخمیر چربی ها در شکمبه تنها براساس اشباع و یا غیراشباع بودن آنها و سپس عبوری کردن اسید چرب میسر است. تغییر این روند در شکمبه امری مطلوب و با کاهش این تخمیر و یا تغییر آن می توان فعالیت های هضمی شکمبه را افزایش داد. از دیدگاه کارشناسان بهترین تغییر در روند تخمیر چربی ایجاد مسیرهای هیدروژناسیون (جهت حذف هیدروژن اضافی) و عبوری کردن اسیدهای چرب حیاتی می باشد. کاهش

اسیدهای چرب بلند زنجیره که بر میکروب های شکمبه بخصوص گروه گرم مثبت ها (مانند رومینوکوکوس فلاووفاسینس و رومینوکوکوس آلبوس) اثر سویی دارد، از دیگر موارد روند تغییر تخمیر چربی می باشد. البته اسیدهای چرب بلند زنجیره بر باکتری های گرم منفی (مانند بوتیرویبریو رومینوکولا و سلنوموناس رومینانتیوم) اثر محرک داشته و رشد آنها را چندین برابر می نماید.

عبوری کردن اسیدهای چرب غیراشباع یا اشباع توسط فرآیندهای شیمیایی مانند صابونی کردن جهت حفاظت اسید چرب از تخمیر میکروبی صورت می گیرد. با مصرف چربی های اشباع، تخمیر چربی ها به دلیل کاهش مصرف هیدروژن در مسیر هیدروژناسیون بشدت کاهش یافته و تنوع باکتریایی به دلیل افت pH شکمبه (ناشی از تجمع هیدروژن) و عدم دسترسی سایر مواد غذایی به جهت روکش چربی کاسته می گردد. البته افزایش اسیدیته مخزن تخمیر می تواند توقف فعالیت لیپولیز و بیوهیدروژناسیون را به همراه داشته باشد. در نهایت چربی ها براساس عناصر سازنده، طبیعت و نوع فعالیتشان بر میکروارگانیسم های شکمبه و روند تخمیر خودشان موثر هستند. بطور مثال؛ ترپنوئیدهای ۵ کربنه (تک شاخه و چند شاخه) و فنیل پروپانوئیدها حلقوی شاخه دار، چربی های موثری در گیاهان محسوب می شوند که در تنوع زیستی میکروارگانیسم ها و فعالیت های تخمیری نقش حیاتی از خود نشان می دهند (جدول ۱-۸). اگر چه چربی ها به ظاهر خواص ضد باکتریایی از خود بروز می دهند، اما سودمندی فراوانی برای محیط تخمیر و دام به همراه خواهند داشت. مثلا روغن گیاهی تیمول (Thymol) از دسته ترپن ها می تواند دی آمیناسیون نامطلوب باکتری ها را متوقف نماید. چربی ها با تغییر میزان و نسبت بین اسیدهای چرب فرار، تغییر اسیدیته به همراه تغییر در متابولیسم پروتئین بر تنوع باکتری های شکمبه موثر می باشند.

۸-۲-۳-۱ اثر چربی بر متابولیسم کربوهیدرات و نیتروژن در شکمبه

همانطور که در مباحث قبلی اشاره شده است، میزان تجزیه چربی ها در شکمبه به اقلام ماده مصرفی، مقدار آن و نوع دام وابسته می باشد. اثر چربی بر فعالیت های میکروبی براساس ترکیب چربی مورد مصرف (وجود اسید چرب اشباع و غیر اشباع، تری گلیسیریدها و اسیدهای چرب آزاد) متفاوت است. اما، در مجموع به دلیل اثر نامطلوب چربی بر فعالیت های میکروبی نرخ تجزیه پذیری آن در شکمبه از اهمیت بالایی برخوردار خواهد بود. برای بیان اثر فعالیت های چربی در شکمبه باید به محل هضم و تخمیر کربوهیدرات ساختاری و غیرساختاری توجه اساسی نمود. محققین در آزمایشات خود بارها به این امر اذعان نموده اند که با غنی سازی چربی در خوراک دام، میزان هضم فیبر در شکمبه کاهش می یابد. بطور مثال؛ افزودن چربی تالو یا خوراک هایی مانند دانه سویا، کلزا، تخم پنبه که روغن گیری نشده اند، به جیره می تواند هضم گراس ها را در شکمبه گوسفندان کاهش دهد. این کاهش

بیشتر مربوط به ممانعت فیزیکی چربی ها (ایجاد نوعی پوشش بر روی مواد فیبری) برای هضم مواد غذایی توسط میکروب ها بخصوص باکتری ها بوده و گاهی با تغییر در نرخ عبور و کاهش ماندگاری مواد فیبری در شکمبه همراه می شود. اما کربوهیدرات های غیر ساختاری می توانند میزان تجزیه پذیری چربی و هیدروژناسیون آنها را کاهش داده و حتی چربی ها نمی توانند بر هضم و تخمیر این کربوهیدرات ها اثر خاصی داشته باشند. لذا با ورود چربی باکتری های هاضم فیبر بخصوص نوع سلولایتیک آنها کاهش یافته و باکتری های آمیلولایتیک (هاضم قند) و لیپولایتیک افزایش می یابند. به همین دلیل پس از مصرف چربی میزان اسید پروپیونیک افزایش یافته و نسبت اسید استیک به پروپیونیک کاهش یابد. همچنین میزان تولید اسید بوتیریک با فرآوری خوراک توسط چربی نیز کاهش یافته و میزان متان تولیدی هم کاهش می یابد.

جدول ۱-۸ اثر چربی های گیاهی بر تنوع میکروبی شکمبه.

نام گیاه	اجزای فعال در روغن	میکروب های حساس به روغن ها
سیر	Allicin, diallyl sulfite	باکتری های بیماری زا و خطرناک شکمبه همراه با پروتلاها
شوید	Limonene, carvone	همه باکتری های گرم منفی و مثبت
فلفل قرمز	Capsaicin	همه باکتری های گرم منفی و مثبت
بادیان رومی	Anethol	بروی باکتریوم ها و آیروموناس ها
پرک هندی	Cinnamaldehyde	ایشرشیاکلی، استافیلو ها، سالمونلاها، پروتلاها و لیستریاها
سرو کوهی	Cadinene, pinene	آیروموناس ها، انتروکوکوس ها و استافیلوکوک ها
چای	Terpinen-4-ol	همه باکتری های گرم منفی و مثبت و ایشرشیاکلی
پونه کوهی	Carvacrol, thymol	همه باکتری های گرم منفی و مثبت
اکلیل کوهی	1,8-Cineole	استافیلوکوک ها، لیستریاها و کمپیلوباکترها
بوته میخک	Eugenol	همه باکتری های گرم منفی و مثبت همراه با لیستریاها
آویشن	Thymol, carvacrol	آسپرژیلوس، سالمونلا، سلنوموناس ها و استروپتوکوکو ها
زنجبیل	Zingiberene,	همه باکتری های گرم منفی و مثبت

۱-(Ross et al., 2001)، ۲- (Deans et al., 1987)، ۳-(Mahmoud, 1994; Ouattara et al., 1997; Smith-Palmer et al., 1998)، ۴- (Hammer et al., 1999)، ۵-(Chao et al., 2000; Cox et al., 2001)، ۶- (Sivropoulou et al., 1996; Dorman et al., 2000)، ۷- (Ouattara et al., 1997; Smith-Palmer et al., 1998)، ۸- (Juven et al., 1994; Mahmoud, 1994; Ouattara et al., 1997;) و ۹- (Chao et al., 2000;).

اضافه کردن چربی بر فعالیت های هضم پروتئین و تخمیر نیتروژن شکمبه اثر چندانی نداشته و حتی می تواند سبب ازدیاد پروتئین میکروبی هم گردد. لذا با مصرف چربی می توان نیتروژن آمونیاکی بیشتری را پس از عادت پذیری استفاده نمود. البته افزایش پروتئین میکروبی می تواند به دو دلیل اساسی یعنی

افزایش انرژی جهت کارآیی بیشتر نیتروژن در شکمبه و کاهش جمعیت پروتوزوئری که مصرف کننده باکتری و ترکیبات پروتئینی هستند و ابقای بیشتری در شکمبه دارند، باشد.

باکتری های گرم منفی مانند بوتیرویبریوها در مقابل گرم مثبت ها با افزایش چربی در جیره حساس تر بوده و رشد و فعالیت آنها کاهش خواهد داشت. البته آزمایشات بعدی نشان داد که باکتری های رومینوکوکوس ها هم به افزایش چربی حساس بوده و کاهش می یابند. لذا اثرات تخریبی چربی بر فعالیت های تخمیری شکمبه کارشناسان را مجاب نمود تا از موادی مانند کلسیم برای تشکیل باندهای صابونی استفاده کنند تا اثر چربی در شکمبه خنثی شود. با خنثی سازی چربی فعالیت باکتری های هاضم فیبر افزایش و میزان اسید استیک تولیدی به حالت مطلوب تر باز می گردد.

۸-۳ اثر خوراک مصرفی بر دستکاری های شکمبه ای

خوراک مصرفی یکی از عوامل بسیار مهمی است که اثر مستقیم بر دستکاری فعالیت های زیستی میکروارگانیسم های شکمبه دارد. با تغییر در مصرف و کیفیت یک خوراک مصرف شده می توان رشد میکروبی و توسعه گونه های آن را مساعد و یا نامساعد نمود. بطور مثال؛ تغییر تناسب علوفه در جیره غذایی می تواند با ایجاد تغییر در بزاق تولیدی دام، تغییرات اسیدیته شکمبه، تغییرات آنیون – کاتیونی جیره، ایجاد نوسان در آبگیری و آبدهی، تغییر در اتصالات میکروبی و سایر موارد بر فعالیت های زیستی میکروب ها اثر بگذارد. مدیریت تغذیه می تواند بر رشد میکروارگانیسم ها و بازده کاری آنها اثر سریع و طولانی مدت ایجاد نماید. رژیم غذایی منظم، کنترل دفعات مصرف و نظم در اقلام مصرفی اثر دراز مدت بر تنوع زیستی میکروب ها داشته و تغییر ناگهانی اقلام جیره و تغییرات بی پایه در دفعات خوراک دهی سبب تغییر سریع تنوع میکروبی می شود. افزایش دفعات خوراک دهی از معیارهای است که می تواند باعث رشد بهتر میکروارگانیسم ها شود. هر چقدر دفعات خوراک دهی بالاتر رود، به دلیل کاهش نوسانات فاکتورهای محیطی تخمیر، بازده میکروبی و جمعیت آنها همراه با تنوع زیستی افزایش می یابد.

۸-۳-۱ دستکاری براساس تغییر میزان خوراک مصرفی

میزان خوراک مصرفی یکی از معیارهای مهمی در دستکاری فعالیت های زیستی میکروارگانیسم های شکمبه محسوب می شود که سال ها از دید بسیاری از کارشناسان مخفی مانده است. با افزایش ماده خشک مصرفی، مواد قابل دسترس در شکمبه بالا می رود. با افزایش مواد مغذی در محیط شکمبه رشد میکروارگانیسم ها با شدت بالاتری افزایش می یابد. در طی افزایش ماده خشک مصرفی اگر اسیدیته ثابت بماند، این افزایش منجر به افزایش بازده و تنوع میکروبی می شود. اما اگر ماده خشک مصرفی با

افزایش اسیدیته همراه گردد، به دلیل نرخ عبور بالاتر احتمال شسته شدن و حذف گونه های میکروبی را شدت می بخشد. از آنجا که دستگاه گوارش دارای یک وضعیت پویا می باشد، ازدیاد مصرف مواد غذایی ترقیق مواد جامد را بالاتر نموده و خروج بیشتر میکروب های چسبیده به مواد غذایی را فراهم می کند. البته گزارشات نشان می دهد که رابط مستقیمی بین بازده میکروبی، تنوع زیستی و جمعیت میکروارگانیسم ها با افزایش مصرف مواد غذایی در شکمبه دیده نمی شود. بلکه این رابط صرفا از طریق تغییر معیارهای محیطی تخمیر حاصل می گردد. از آنجا که نرخ رقت اولین معیار موثر بر جمعیت های میکروبی در مصرف بیشتر مواد غذایی می باشد، بررسی ها در این زمینه نشان داده است که نرخ مزبور در بخش مایع و جامد شکمبه همبستگی مثبت داشته و با بالا رفتن خوراک نرخ رقت افزایش می یابد. بالعکس با کاهش مصرف خوراک نرخ رقت جهت هضم بیشتر مواد مغذی موجود کمتر می شود. افزایش نرخ رقت اگر چه بازده میکروبی را افزایش می دهد، اما تنوع گونه های میکروبی را کاهش داده و جمعیت اکثر گونه های سلولایتیکی را دستخوش تغییر (بیشتر سبب کاهش آنها می گردد) می کند. بعد از نرخ رقت، اسیدیته مخزن تخمیر از دومین معیار وابسته به مصرف بیشتر مواد مغذی محسوب می شود. افزایش مصرف در اکثر موارد (بجز مواد کربوهیدراتی سهل الوصول) منجر به ترشح بیشتر بزاق می شود. بزاق سبب قلیا شده محیط شکمبه شده و تنوع باکتری ها را برای فعالیت های بیشتر میکروبی افزایش می دهد.

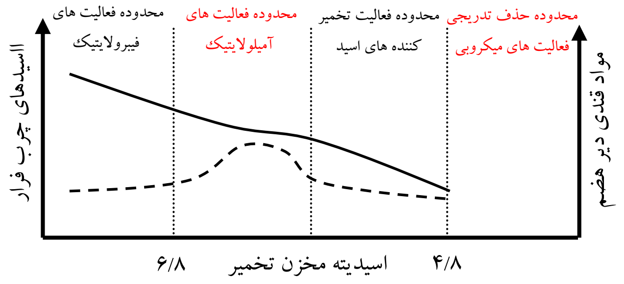
۱-۱-۳-۸ عمل آوری فیزیکی

هدف اصلی عمل آوری فیزیکی مواد مغذی در دسترس قرار دادن بیشتر مواد جهت تخمیر می باشد. فرآوری های فیزیکی بر دو نوع خشک (غلطک کوب و ...) و مرطوب (حبه سازی و ...) طبقه بندی می شود. نوع عمل آوری فیزیکی می تواند بر جمعیت میکروب ها و تنوع آنها اثر بسزایی داشته باشد. مهمترین عمل آوری های فیزیکی موثر بر دستکاری فعالیت های زیستی میکروبی را خرد کردن مواد غذایی و آرد نمودن در نظر می گیرند. خرد و آرد کردن مواد مغذی علاوه بر دسترسی راحتر میکروب ها سبب افزایش مصرف به دلیل کاهش حجم خوراک مصرفی می شود. البته تاثیر هر دو عمل آوری بر دستکاری میکروبی زمانی یکسان خواهد بود که میزان مصرف آنها در حد مطلوب و با تعادل سایر مواد مغذی باشد. در اکثر اوقات بالا رفتن مصرف مواد آردی به دلیل افزایش اسیدیته و نرخ عبور بیشتر، می تواند جمعیت باکتریایی را کاهش داده و شسته شدن آنها را از مخزن تخمیر گسترش دهد. اما خرد کردن اثرات نامطلوب کمتری در مخزن تخمیر ایجاد می نماید. بکارگیری قطعات ۱/۵ تا ۲ سانتی متری در جیره غذایی می تواند بیشترین فعالیت میکروبی را رقم بزنند. کاهش در اندازه قطعات خوراکی

تولید اسیدهای چرب فرار را از استیک به پروپیونیک تغییر داده و جمعیت باکتری های سلولایتیک را کاهش می دهد.

۸-۳-۲ دستکاری براساس تغییر کیفیت خوراک مصرفی

کیفیت خوراک مصرفی از معیارهای بسیار مهمی در دستکارهای زیستی شکمبه محسوب می شود که مباحث زیادی در پیرامون آن مشاهده می گردد. مهمترین مباحث کیفیت خوراک مصرفی در دستکاری ها مربوط به قابلیت هضم ماده غذایی، نوع و ساختار ماده خوراکی و تناسب اقلام در جیره مصرفی می باشد. کیفیت ماده خوراکی ابتدا براساس کنترل میزان مصرف می تواند بر تنوع میکروبی و فعالیت های زیستی آنها موثر شوند. این کنترل از طریق گلوکز، اسیدهای چرب فرار، چربی ها، اسیدهای آمینه و اسیدیته صورت می گیرد. سپس کیفیت خوراک مصرفی برپایه قابلیت هضم یک ماده بر رشد گونه میکروبی موثر خواهد بود. در حالت پایدار و پویا هر چقدر قابلیت هضم یا ماده غذایی بیشتر باشد، جمعیت میکروب ها به دلیل حداکثر شدن رشد آنها بیشتر می شود. اما ازدیاد یک ماده غذایی با قابلیت هضم بالا مانند نشاسته یا اوره به دلیل تغییرات نامطلوب و سریع معیارهای محیطی تخمیر بخصوص اسیدیته و آمونیاک می تواند اثرات سویی بر فعالیت های میکروبی و جمعیت آنها داشته باشد. بعد از قابلیت هضم ماده غذایی، نوع و ساختار ماده خوراکی می تواند عامل موثری در تنظیم جمعیت میکروب ها باشد (شکل ۳-۸). مثلا بدین معنی که نوع کربوهیدرات مصرفی براساس ساختار و نحوه قرارگیری واحدهای قندی بر سرعت آزادسازی مواد قندی موثر و بالطبع جمعیت میکروبی را تغییر می دهد. یعنی بین واحد قندی موجود در نشاسته ذرت و جو تفاوت اساسی است و سرعت آزادسازی واحدهای قندی از جو بیشتر از ذرت می باشد.



شکل ۳-۸ ارتباط بین ساختار کربوهیدرات ماده خوراکی، اسیدیته و تنوع میکروبی (خط کامل: اسید استیک و خط چین: اسید پروپیونیک).

محققین در انتها برای مشخص کردن اثر کیفیت خوراک مصرفی در دستکاری ها میکروبی به تناسب اقلام مصرفی توجه می نمایند. اگر چه سطح تماس یک ماده غذایی و قابلیت هضم آن همراه با

ساختار تشکیلاتی در دستکاری های میکروبی اهمیت دارد، اما قابلیت دسترسی هماهنگ (سرعت آزادسازی یکسان) و تناسب چند ماده غذایی به شکل مطلوب می تواند در رشد و توسعه گونه های میکروبی بشدت موثر باشد. بطور مثال؛ هماهنگی بین منابع انرژی و نیتروژن در مواد مغذی از اثر گذارترین موارد در دستکاری زیستی محسوب می شود. ورود انرژی سهل الوصول جو و ملاس در کنار نیتروژن اوره یا پودر ماهی با سرعت آزادسازی سریع و یا آزادسازی انرژی با سرعت کم در ذرت مقابل مواد پروتئینی سویا می تواند تعادل میکروبی و توسعه گونه های آن را رقم بزنند. از مهمترین مثال هایی که می توان در زمینه تناسب اقلام مواد مغذی بیان نمود، نسبت بین علوفه و مواد متراکم مصرفی می باشد. این نسبت به شدت بر اسیدیته، اسیدهای چرب فرار، متان تولیدی و سایر معیارهای تخمیری موثر خواهد بود. براساس تاثیرات فوق این نسبت به طور مستقیم می تواند بر جمعیت گونه های میکروبی و نسبت بین آنها موثر باشد. این نسبت براساس نوع دام و هدف تولیدی متغیر مشاهده می شود.

۱-۲-۳-۸ عمل آوری شیمیایی

عمل آوری شیمیایی صرفا جهت شکستن پیوندهای نامطلوبی است (مانند لیگنین) که با حذف آنها آزادسازی انرژی و پروتئین حداکثر می شود. روش های عمل آوری شیمیایی براساس نوع خوراک متنوع و بر دو بخش واکنش های بدون حرارت (عمل آوری سرد) و با حرارت (عمل آوری گرم) تقسیم می گردد. خطر اصلی عمل آوری شیمیایی برای دستکاری های زیستی میکروبی بیشتر در زیرگروه عمل آوری سرد مشاهده می شود. در روش بدون حرارت مواد غذایی در مجاورت یک ماده شیمیایی قرار گرفته و تخریب آغاز می گردد. کنترل عناصر سمی در این روش سخت و تقریبا پاکسازی آن دور از دسترس خواهد بود. بطور مثال؛ استفاده از هیدروکسید سدیم و یا آمونیاک در شکستن لیگنین می تواند بر تخمیر شکمبه و تنوع میکروبی اثر سویی داشته باشد. اما روش عمل آوری با حرارت از ارزش بیشتری برای افزایش قابلیت هضم ماده غذایی برخوردار بوده و در دستکاری فعالیت های زیستی اثر مطلوب تری از خود نشان می دهد. با کمک حرارت می توان آب داخل ماده غذایی را خارج و واکنش های شیمیایی خاصی را بوجود آورد. عمل آوری با حرارت می تواند سرعت تجزیه پذیری دسته ای از مواد غذایی را افزایش داده و جمعیت میکروارگانیسم های شکمبه را تحت تاثیر قرار دهد. پختن مواد غذایی می تواند عامل اصلی افزایش اسید پروپیونیک در شکمبه باشد. افزایش پروپیونیک فعالیت باکتری های آمیلولایتیک را در برابر سایر میکروارگانیسم ها افزایش داده و جمعیت آنها را توسعه می دهد. البته عمل آوری با حرارت خواص متفاوتی را در مواد مغذی ایجاد می نماید. مثلا پختن مواد پروتئینی مانند پودر ماهی یا سویا برعکس نشاسته سبب عبوری شدن پروتئین ها و دور کردن آنها از دسترس میکروب های شکمبه می شود.

۳-۳-۸ دستکاری براساس ورود مواد غیر مغذی

علاوه بر مواد مغذی، گروهی از مواد غیر مغذی هستند که برای افزایش تولیدات تخمیری، تغییر فلور میکروبی شکمبه و تغییر مسیرهای تخمیر کاربرد فراوانی دارند. بعضی از این مواد به طور مستقیم و دسته ای دیگر به شکل غیر مستقیم بر تنوع میکروبی و تولیدات تخمیری شکمبه اثر می گذارند. این مواد گاه به طور طبیعی در جیره حاضر شده و گاهی به شکل مصنوعی در خوراک مصرفی تزریق می شوند.

۱-۳-۳-۸ بافرها

از آنجا که فعالیت های تخمیری شکمبه و تنوع زیستی میکروبی بشدت تابع اسیدیته مخزن می باشد، می توان با کنترل اسیدیته که خود به اسیدهای چرب فرار و هیدروژن تولیدی وابسته است، دستکاری بیوشیمیایی و اکولوژیکی شکمبه را همزمان انجام داد. اگر pH شکمبه بهینه نباشد، مصرف ماده خشک کاهش یافته و نرخ رقت دستخوش تغییر می شود. هر دو عامل می تواند بطور مستقیم تنوع زیستی میکروبی شکمبه را تغییر دهند. از طرفی بروز اسیدوز می تواند سلامتی شکمبه را به خطر انداخته و باعث کاهش تولید پروتئین میکروبی، کاهش قابلیت هضم ماده خوراکی بخصوص فیبر جیره و حذف گونه های میکروارگانیسمی بخصوص سلولایتیکی، متان ساز و پروتوزوئرها گردد. در صورت ادامه یافتن روند افزایشی اسیدیته شکمبه باکتری های مقاوم به اسید مانند آمیلولایتیک ها و تخمیر کنندگان اسید کاهش می یابند. با تغییر اسیدیته فعالیت های سلولاز و آمیلازی تغییر یافته (شکل ۳-۸) و با تغییر مطلوب آن می توان جمعیت باکتری ها را در مسیر هدفمند توسعه داد.

بافرها که جزء تنظیم کننده های اسیدیته شکمبه محسوب می گردند، عموما از سه اصل (۱) بایستی یک اسید یا باز ضعیف یا نمک آن باشند، (۲) محلول باشند و (۳) تعادل نقطه pK آن بایستی نزدیک pH فیزیولوژیک باشد، تبعیت می کنند. این ترکیبات در مقابل تغییرات pH مقاومت می نمایند. بافرها از سه طریق طبیعی در بزاق نشخوارکنندگان، موجود در علوفه ها (بخصوص سری لگوم ها) و از مواد شیمیایی تامین و مصرف می شوند. ترکیبات دیگری علاوه بر بافر وجود دارند که سبب افزایش pH مایع شکمبه ای شده و تحت عنوان ترکیبات بازی کننده یا خنثی کننده شناخته می شوند. استفاده صحیح از بافرهای غذایی ممکن است سازگاری میکروارگانیسمی را به نوع جیره مصرفی که افزایش دهنده اسیدیته هستند، افزایش دهد. افزایش اسیدیته شکمبه با تجمع اسیدهای چرب فرار بخصوص اسیدلاکتیک تولیدی به میزان ۴۰ ـ ۳۰ درصد افزایش می یابد. البته با تجمع اسید استیک به میزان ۵۰ ـ ۴۰ درصد اسیدیته شکمبه کاهش خواهد یافت. با تغییر خوراک مصرفی از حالت علوفه به دانه، علوفه

بلند و خشک به کوتاه و تازه، خوراک پر رطوبت و یا مصرف مواد سیلویی فراوان استفاده از بافرها برای تنظیم اسیدیته لازم می گردد. اما در هنگام استفاده از بافر لازم است ترکیب شیمیایی آنها مدنظر قرار گیرد. مهمترین بافرهای مورد استفاده در تنظیم اسیدیته مخازن تخمیر اکسید منیزیوم (ترکیب بازی کننده که بافر محسوب نمی شود)، بی کربنات سدیم (بافر حقیقی)، بی کربنات پتاسیم و مشتقات بنتونیت (مانند بنتونیت سدیم یک بافر حقیقی است) می باشد. معمول ترین روش تغییر اسیدیته استفاده از بی کربنات سدیم (جوش شیرین) است. آزمایشات ارائه شده در این زمینه نشان می دهد که واکنش بافرها در دستگاه گوارش متفاوت می باشد (جدول ۲-۸). اگر چه مکانیسم های متفاوتی برای عمل نموده بافر پیشنهاد شده است، اما باید به مکانیسم افزایش رقت آنها که بر جمعیت میکروب ها به شدت تاثیر می گذارد، توجه کرد. افزایش رقت به دلیل انتشار بالای آب از دیواره مخزن به داخل مخزن می باشد.

جدول ۲-۸ اثر بافر بر تخمیر شکمبه ای.

معیار	بی کربنات سدیم	سنگ آهک	اکسید منیزیوم	بنتونیت سدیم
اسیدیته شکمبه	کاهشی	بی اثر	کاهشی	کاهشی
استات: پروپیونات	افزایشی	بی اثر	افزایشی	افزایشی
هضم فیبر	افزایشی	احتمالا ناموثر	افزایشی	احتمالا موثر
هضم نشاسته	احتمالا ناموثر	احتمالا ناموثر	احتمالا موثر	احتمالا موثر

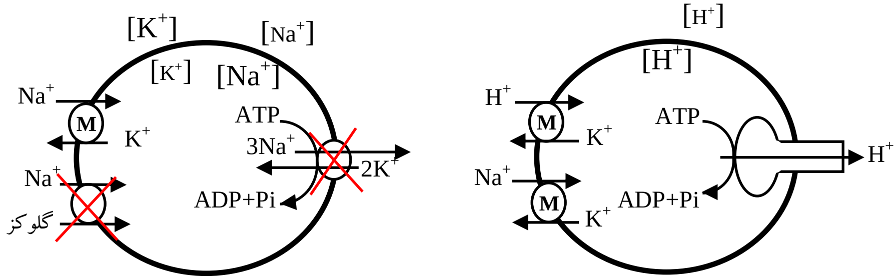
محققین قابلیت بافری ۳۵ ماده مصرفی را در آزمایشگاه با استفاده از مایع شکمبه به دست آمده از گاوهایی که جیره های حاوی کنسانتره و علوفه و یا فقط جیره های حاوی کنسانتره دریافت کرده بودند، تعیین کردند. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که سدیم و بافرهای حاوی سدیم بهترین نوع بافرها در تنظیم اسیدیته و تنوع زیستی میکروب های شکمبه می باشند . پتاسیم نسبت به کلسیم و کلسیم نسبت به آلومینیوم، منیزیم، منگنز و آمونیم بهتر است. نمک های روی قابلیت بافری بسیار کمی از خود نشان می دادند. بهترین آنیون های بافری شامل استات، بی کربنات، کربنات و دی فسفات ها می باشند. بورات، سیترات، لاکتات و پروپیونات، آنیون های ضعیف هستند، در حالی که بنتونیت ها زمانی که اجازه داده شوند در مایع شکمبه حل گردند، بافرهای خوبی محسوب می شوند. آزمایشات نشان داده است که استفاده از بافرها درطی دوران عادت پذیری دام به خوراک جدید و ایجاد گونه میکروبی مناسب در شکمبه مطلوب و سبب افزایش کارائی آنها می شود.

۲-۳-۳-۸ یونفرها

یونفرها اولین بار در اواسط قرن بیستم جهت تغذیه نشخوارکنندگان بکار گرفته شدند. استفاده از آنها باعث بهبودی رشد دام، عملکرد مناسب در جیره مصرفی و سلامتی دام ها می گردید. اما امروزه از یونفرها به صورت تخصصی تر جهت کنترل تخمیر شکمبه، توسعه جمعیت های خاص میکروبی و القای شرایط جدید تخمیری استفاده می شود. مهمترین یونفرهایی که امروزه در تغذیه گاوها و سایر نشخوارکنندگان مورد استفاده قرار می گیرد، شامل موننسین (monensin)، لاسالوسید (lasalocid)، تتروسین (tetronasin)، سالینومایسین (salinomycin)، لیزوسلین (lysocellin)، ناراسین (narasin)، نیگرسین (nigricin)، لیدلومایسین (laidlomysin) و والینومایسین (valinomycin) می باشد. یونفرها (IOP) ترکیباتی لیپوفیلیک (Lipophilic) هستند که برای بسیاری از باکتری ها، پروتوزئرها، قارچ ها و موجودات آلی سمی و کشنده می باشند. یونفرها ملکول هایی هستند که ساختمان انشعابی داشته و بواسط طرز قرار گرفتن اتم های اکسیژن مشخص می شوند. این ترکیبات در چربی محلول می باشند. سمیت این مواد به خاطر نفوذ این ترکیبات به غشا سلولی و تغییر بار یونی در داخل سلول می باشد. یونفرها با اتصال به بارهای مثبت و حمل آنها (سدیم، پتاسیم، منیزیوم و کلسیم) به داخل غشای سلولی و ایجاد تغییر بار یونی داخل سلول مرگ میکروب را باعث می شود. بعضی از یونفرها مانند نیگرسین، و مونسین به عنوان antiport هستند (یعنی به محض ورود به مخزن تخمیر یون های تک ظرفیتی درون سلول را با H درون سلولی مبادله می کنند). یونفرهای آنتی پورت دیواره باکتری را در تمام جهات به یون هیدروژن نفوذ پذیر می کنند. این عمل برای فسفوریلاسیون (ساخت ATP) میکروب یک مزاحمت محسوب می شود. در این حالت باکتری گرم منفی به دلیل داشتن مکانیسم خاص در فسفوریلاسیون، مشکلی نخواهد داشت. در حالی که دیگر یونفرهایی مانند والینومایسین، به صورت uniporte عمل می کنند. یعنی کاتیون ها را بدون اینکه با یون هیدروژن مبادله نمایند، به داخل سلول می برند. یونفرهایی که به این گروه تعلق دارند، به کاتیون های خاصی اتصال پیدا می کنند. با ورود و خروج کاتیون های مختلف فشار اسمزی داخل سلولی برهم خورده و پولاریزاسیون غشاء افزایش می یابد. مونسین یونفری است که به یون سدیم اتصال می یابد و می تواند با یون پتاسیم نیز باند شود. مونسین ورود گلوکز را به باکتری متوقف و اسیدیته داخلی باکتری را افزایش می دهد. برعکس ترونازین (tetronasin) تمایل به اتصال به کاتیون های دو ظرفیتی مانند کلسیم و منیزیوم دارد. این عمل باعث ماندگاری بیشتر کاتیون ها درون سلول و افزایش pH آنها می شود. یونفرها با تغییر در بار یونی و به هم زدن سیستم الکترونی، تغییر فعالیت پمپ سدیم- پتاسیم و تغییر پمپ هیدروژن باعث تغییر بار یونی سلول ها می شوند (شکل ۴-۸). حساسیت انواع باکتری ها به یونفرها متفاوت است. باکتری

های گرم منفی دارای ترکیبات پیچیده ای در ساختار خود بوده که مانع از نفوذ یونفرها به داخل آنها می شود. در عوض باکتری های گرم مثبت حساسیت بیشتری به یونفرها داشته و به سرعت از بین می روند.

در شکمبه یونفرها با تاثیر روی باکتری های شکمبه ای (به خصوص باکتری های گرم مثبت) شرایط تخمیر شکمبه ای را تغییر داده و با افزایش انرژی و مصرف بهینه نیتروژن در شکمبه، شرایط بهتری را برای تخمیر فراهم می نمایند. باکتری های گرم مثبت موجود در شکمبه (مانند رومینوکوکسی و ائوباکتریوم)، بیشتر محصولاتی مانند استات، بوتیرات، فومارات، لاکتات، هیدروژن و آمونیاک تولید می کنند. بیشتر این محصولات به صورت جفت و همراه با تولید متان در شکمبه تولید می شوند. اما یونفرها قادرند به دلیل حبس هیدروژن داخل سلول باکتری گرم مثبت فعالیت آنها را برای خروج هیدروژن متوقف و تولید متان (بالای ۱۲ درصد کربن و انرژی را مصرف می کند) را به دلیل کاهش حضور یون هیدروژن در محیط تخمیر (مایع مخزن) کاهش دهند. حبس هیدروژن در درون سلول باکتری سبب مساعد شدن محیط مخزن جهت تخمیر بیشتر و افزایش توده میکروبی (به دلیل فعالیت سریع سایر میکروب ها) می شود.



شکل ٤-٨ اثر موننسین بر فعالیت های دیواره سلولی میکروارگانیسم ها (سمت راست براساس توقف جریان پروتونی جهت فسفوریلاسیون و سمت چپ توقف پمپ سدیم - پتاسیم).

البته یونفرها می توانند محرک رشد برای باکتری های گرم منفی (سلنوموناس رومینانتیوم، مگاسفرا السدنی، پروتلا بریانتی و غیره) که تولید کننده پروپیونات و سوکسینات می باشند، قلمداد شوند. با کاهش فعالیت باکتری های گرم مثبت و افزایش فعالیت باکتری های گرم منفی در حضور یونفرها نسبت پروپیونات به استات افزایش می یابد. همچنین یونفرها باعث کاهش غذای مصرفی در دام ها شده و بالطبع نرخ رقت را کاهش می دهند. کاهش نرخ رقت زمان لازم را برای فعالیت باکتری های فیبرولایتیک را در کنار باکتری های آمیلولایتیک فراهم می نماید. البته با افزایش تعداد دفعات خوراک دهی می توان کاهش مصرف خوراک را جبران نمود. اما اثر یونفرها بر روی باکتری های فیبرولایتیک با توجه به توضیحات قبلی همچنان مبهم است. زیرا با آنکه اثر مهار کنندگی جزئی بر روی آنها دارد،

ولی میزان هضم الیاف تغییر چندانی نمی کند. البته علت عدم تغییر را می توان به افزایش ماندگاری الیاف در شکمبه مربوط دانست.

لازم به ذکر است باکتری های تولید کننده اسیدلاکتیک (لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس بوویس و غیره) نسبت به یونفرها حساس بوده، و با مصرف یونفرها تولید اسید لاکتیک کاهش می یابد. یونفرها با فعال نمودن مسیر آکریلیک (Acrylate pathway) تولید پروپیونات را از لاکتات افزایش می دهند. وجود اسید لاکتیک بالا در شکمبه احتمال بروز اسیدوز را افزایش می دهد و باعث کاهش شدید pH شکمبه می شود. بنابراین می توان با استفاده از یونفرها، تا حدودی خطر حذف گونه های میکروبی ناشی از افزایش اسیدیته را کاهش داد. از دیگر موارد دستکاری فعالیت های زیستی و جمعیتی میکروب ها توسط یونفرها کاهش فعالیت باکتری های پروتئولایتیک (تجزیه کننده پروتئین ها) و در نتیجه کاهش تجزیه اسیدهای آمینه و کاهش غلظت آمونیاک در شکمبه می باشد. به عبارت دیگر یونفرها باعث عبوری شدن پروتئین ها و اسیدهای آمینه موجود در مواد خوراکی می شود. به طور کلی یونفرها با تغییر جمعیت میکروبی شکمبه، انرژی و پروتئین قابل دسترس تری را برای دام ها تامین می نمایند.

آزمایشات نشان می دهد بعضی از میکروب ها بخصوص گروه گرم منفی ها و در تعداد اندکی از گرم مثبت ها مقابل یونفرها خنثی بوده و غشای آنها حساسیتی برای انتقال یون ها از خود بروز نمی دهند. باکتری پروتلا رومینوکولا از گروه گرم منفی ها ابتدا در برابر یونفر حساس بوده و به مرور زمان در برابر یونفرها مقاوم می شوند. این مقاومت ناشی از تغییر رویه باکتری در اتصال یونفر به غشای درونی می باشد. استرپتوکوکوس بوویس، کلستریدیوم آمینوفیلوم و سلنوموناس رومینانتیوم از گروه گرم مثبت ها به شدت در برابر یونفر حساس می باشند. اما این باکتری ها در مجاورت های طولانی مدت با یونفر، مقاومت از خود نشان می دهند. این مقاومت از طریق افزایش پلی ساکاریدهای خارج سلولی غشای میکروب می باشد که تماس با یونفر را محدود می کند.

۳-۳-۸ زئولیت ها (کلینوپتیلولیت Clinoptilolite)

از جمله راه های افزایش بازدهی خوراک، تغییر تنوع زیستی میکروبی و تغییر فعالیت های تخمیری افزودن برخی از ترکیبات زئولیتی یا آنزیمیت به جیره های غذایی مورد استفاده دام ها می باشد. این دسته از مواد اواسط قرن بیستم بصورت رایج در دامداری ها مورد استفاده قرار گرفت. تاکنون بیش از ۵۰ نوع زئولیت طبیعی با خواص متفاوت کشف شده که به ۹ گروه اصلی (سدیک، سدیک پتاسیک، سدیک کلسیک، سدیک پتاسیک کلسیک و غیره) طبقه بندی می شوند. علاوه بر کانی های طبیعی بیش از یکصد نوع زئولیت به طور مصنوعی تولید که هر کدام خواص فیزیکی خاصی دارا هستند. زئولیت در اصل بلورهای آلومینوسیلیکات هیدارته با فرمول شیمیایی عمومی

$M_{n/2}O.Al_2O_3.XSio_2.yH_2O$ (فلزات قلیایی = M، ظرفیت = n و ۱۰-۲ = X و۷-۲ = Y) می باشد که دارای کاتیون هایی از خانواده فلزات قلیایی خاکی می باشند. از ویژگی های مهم زئولیت تبادلات کاتیونی و دارا بودن قابلیت برگشت پذیر جذب و دفع آب بدون ایجاد تغییر عمده در ساختمان مولکولی آنها می باشد.

آنزیمیت ها به دلیل جذب گازهای آمونیومی در شکمبه و در نهایت آزادسازی تدریجی آمونیاک (زئولیت ها یون های آمونیوم حاصل از تجزیه آنزیمی ترکیبات نیتروژن دار غیرپروتئینی (NPN) را بلافاصله با کاتیون های ساختمانی خود مبادله نموده و برای چند ساعت در خود نگه می دارند) می تواند فعالیت های میکروبی را جهت ساخت پروتئین میکروبی مطلوب نماید. زئولیت ها با جذب اسیدهای چرب فرار و آمونیاک از افت ناگهانی pH شکمبه جلوگیری کرده و محیط مناسبی برای فعالیت باکتری های سلولایتیک با ارائه کاتیون های لازم پتاسیم، کلسیم، کبالت و منیزیم فراهم می کند. باکتری مزبور توانائی تجزیه و هضم فیبر غذا را دارا بوده و موجب افزایش نسبت استات به پروپیونات شکمبه می شود. در واقع زئولیت ها با تنظیم آمونیاک شکمبه در دامنه مطلوب می توانند هضم فیبرها را گسترش دهند. لازم به ذکر است که آزمایشات نشان می دهد زئولیت ها بر تولید کل اسیدهای چرب فرار بی تاثیر و تنها بر نسبت های درونی اسیدهای چرب فرار اثر گذار خواهند بود. باید در نظر داشت که در هنگام مصرف زئولیت میزان ماده خشک مصرفی هم افزایش می یابد. در نتیجه ترشح بزاق که حاوی ترکیبات بافری است زیادتر شده و به این ترتیب از اسیدی شدن محیط شکمبه و نفخ که عوامل نامطلوب در تغییر گونه های میکروبی می باشند، جلوگیری می نماید. مصرف بیشتر ماده خشک نرخ عبور را در مخازن پویا مانند شکمبه افزایش داده و مواد نشاسته ای را به جای هضم در شکمبه به روده انتقال می دهد. نشاسته در روده به گلوکز تبدیل و از تبدیل اسیدهای آمینه به عنوان منبع انرژی در بدن دام جلوگیری می کند. زئولیت ها می توانند حتی با افزایش pH روده، فلور میکروبی آن را گسترش و از دفع مواد مغذی بخصوص نشاسته و پیش ساز ویتامین ها جلوگیری و جذب آن را به دلیل تخمیر روده ای (در روده بزرگ و سکوم) بیشتر نمایند.

زئولیت ها از تکثیر و گسترش باکتری های سازنده اسید لاکتیک جلوگیری نموده و فعالیت باکتری های متان ساز را کنترل می نماید. از دیگر تاثیرات مهم زئولیت ها در تنوع میکروبی و تخمیر شکمبه ای جذب عناصر سمی فلزی، قارچی و شوینده ای نامطلوب از مخزن تخمیر می باشد. با کاهش محدود کننده های رشد میکروبی عنوان شده می توان تنوع و جمعیت میکروبی را گسترش داد. زئولیت با جذب سموم قارچی مانند آفلاتوکسین ها و سایر مایکوتوکسین ها می تواند محیط تخمیر را برای

شرایط بهتر هضم و گسترش جمعیت میکروبی آماده نماید. با این وجود همچنان مکانیسم های مختلف عمل زئولیت بر روی فعالیت های تخمیر شکمبه ای، هنوز در هاله ای از ابهام قرار دارد.

۸-۳-۳-۴ پروبیوتیک و پربیوتیک ها

واژه پروبیوتیک از دو کلمهٔ یونانی "پرو" و "بیوتیک" به معنی "برای زندگی" ریشه یابی شده است. پروبیوتیک ترکیبات میکروبی (زنده و یا غیر زنده) هستند که بعد از کشت مستقیما به جیره دام و طیور اضافه شده و اثرات بسیار مطلوبی بر عملکرد تخمیر و سلامت آن خواهد داشت. این ترکیبات به سه شکل زنده (تضمین شده)، زنده یا مرده (تضمین جهت زنده ماندن وجود ندارد) و مرده (عصاره میکروبی) تهیه می شوند. استفاده از این ترکیبات همانند زئولیت ها در خوراک دام و طیور به شکل گسترده ای از اواخر قرن نوزدهم مورد ارزیابی قرار گرفته است. این میکروارگانیسم های کشت شده نه تنها ایجاد اختلال در تخمیر نمی کنند، بلکه از تکثیر و رشد باکتری های مخرب نیز در دستگاه گوارش جلوگیری کرده و موجب افزایش جمعیت میکروارگانیسم های مفید در سیستم گوارش می شوند. پروبیوتیک ها را می توان بر دو بخش اصلی (۱) گروهی که در دستگاه گوارش تشکیل کلونی می دهند (لاکتوباسیل ها، انتروکوک ها و استرپتوکوک ها) و (۲) گروهی که آزادانه شناور و تشکیل کلونی نمی دهند (باسیلوس ها و ساکارومایسس ها)، طبقه بندی نمود. در اوایل انتخاب سویه های میکروبی به عنوان پروبیوتیک، عمدتاً به طریق تجربی و غیر علمی انجام می شد. اما امروزه با افزایش آگاهی درباره پروبیوتیک ها، توجه خاصی به خصوصیات و توانایی آنها در تشکیل کلونی شده است. سویه هایی که به عنوان پروبیوتیک استفاده می شوند معمولاً به جنس های پروپیونونی باکتریوم، استرپتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، کلستریدیوم، باکتروئیدس، آسپرژیلوس، ساکارومایسس و گونه بیفیدوباکتریوم تعلق دارند (جدول ۳-۸). برخی از ویژگی های فیزیولوژیک این دسته از باکتری ها مانند زنده مانی بالا در اسیدیته زیاد، مقاومت به آنتی بیوتیک های مصرف شده، تحمل به انواع نمک های معدنی و دامنهٔ حرارتی مناسب سبب شده است به عنوان عوامل پروبیوتیکی مطلوب باشند. معروف ترین پروبیوتیک مصرف شده در جهان از باکتری های لاکتوباسیلوس و مخمر (بخصوص گونه ساکارومایسس ها) حاصل شده است. پروبیوتیک های حاصل از مگاسفرا السدنی اسید لاکتیک را به طور مشخص کم و مصرف کننده اسیدهای چرب فرار نامطلوب می باشند. این پروبیوتیک می تواند اسیدهای چرب فرار را به سمت تولید اسید استیک و پروپیونیک و تا حد کمی بوتیرات سوق دهد.

بطور کلی پروبیوتیک ها باید ویژگی های ذیل را داشته باشند تا بتواند به عنوان محرک یا مکمل در خوراک مورد استفاده قرار بگیرند. این عوامل شامل: (۱)- تا حد امکان از میزبان منشاء گرفته و قدرت ماندگاری بالایی در شکمبه داشته باشند، (۲)- بیماری زا نبوده و خواص آنتی میکروبی بروز ندهند،

(۳)- در صورت استفاده از باکتری های غیر شکمبه ای قابلیت انطباق پذیری بالایی از خود نشان دهند، (۴)- در طی تولید هنگام مواجه شدن مقابل عوامل شیمیایی، مکانیکی و دمایی قابلیت زنده ماندن داشته و در نهایت (۵)- قدرت تولید ترکیبات مهار کننده از پیش تعیین شده داشته و قابلیت تغییر گونه های میکروبی را ارائه دهند.

جدول ۳-۸ جنس و گونه های میکروارگانیسمی رایج جهت استفاده پروبیوتیکی.

مخمر	گرم منفی	گرم مثبت			
ساکارومایسس	باکتروئیدس	کلستریدیوم	پروپیونی باکتریوم	استرپتوکوکوس	لاکتوباسیلوس
Cerevisiae	Amylophilus	Bacillus	Freudenreichii	Cremoris	Acidophilus
Boulardii	Capillosus	Cereus	Shermanii	Diacetylactis	Brevis
Pastorianus	Ruminicola	Coagulans	Pediococcus	Intermedius	Bulgaricus
	Suis	Licheniformis	Acidilacticii	Lactis	Casei
		Natto	Cerevisiae	Thermophilus	Cellobiosus
		Pumilus	Pentosaceus	Enterococcus	Curvantus
		Subtili	Bifidobacterium	Faecium	Delbrueckii
		Toyoi	Adolescentis	Leuconostoc	Fermentum
			Animalis	Mesenteroides	Nelveticus
			Bifidum		Lactis
			Infantis		Plantarum
			Longum		Renteri
			Thermophilum		

علاوه بر پروبیوتیک ها دسته ای از مواد به نام پربیوتیک وجود دارد که قدرت هضم مواد غذایی را نداشته و تنها سبب رشد و توسعه گونه های خاص میکروبی می شوند. اما این محرک ها بیشتر در بخش انتهایی دستگاه گوارش بخصوص در تک معده ای ها (بخصوص اسب سانان، طیور و خوک) مناسب می باشند. با کمک پربیوتیک ها می توان مواد مغذی بخصوص قندهای گروه اولیگوساکاریدی را از شکمبه دام های شیرخوار عبور داده و آنها را در روده و روده بزرگ در اختیار دام و میکروب های آن منطقه قرار داد. همچنین، می توان مخلوطی از پربیوتیک و پروبیوتیک را تهیه نمود که علاوه بر کنترل و تنظیم تولیدات تخمیری در شکمبه، فعالیت های تخمیر روده ای را جهت ساخت ویتامین های خاص و سایر مواد ویژه افزایش داد. پروبیوتیک ها در کنار پربیوتیک ها می توانند علاوه بر تنظیم هضم و تخمیر مواد غذایی در جایگاه های مختلف دستگاه گوارش از بروز اسهال در دام های جوان جلوگیری نمایند.

نقش پروبیوتیک ها در تغییرات فعالیت های زیستی شکمبه براساس نوع میکروارگانیسم کشت شده متفاوت می باشد. بطور مثال؛ مصرف پروبیوتیک زنده حاصل از مخمر (مانند ساکارومایسس سرویسه) سبب افزایش خوراک مصرفی و تولیدات تخمیری مانند اسید استیک می شود. مخمرها سبب ازدیاد جمعیت باکتریایی شکمبه بخصوص گونه های سلولایتیک شده و سبب کاهش اسیدیته و افزایش نسبت اسید استیک به پروپیونیک می شوند. مخمرها می توانند میزان تخمیر کربوهیدرات ها را کنترل و در

آزادسازی انرژی تاخیری ایجاد نموده تا تعادلی در تخمیر پروتئین و مواد قندی بوجود آید. مخمرها برای سم زدایی اکسیژن شکمبه که از طریق بزاق، خوراک و تنفس وارد مخزن تخمیر شده اند، مناسب بوده و می تواند همراه با باکتری انتروباکتر ایروجنز (*Enterobacter aerogenes*) محیط شکمبه را بی هوازی نگاه دارند. در حالیکه بعضی از کشت های پروبیوتیکی مانند آسپرژیلوس اوریزآ می تواند تخمیر اسیدلاکتیک را متوقف و سپس تولید اسید استیک را به جهت ازدیاد باکتری های سلولایتیک بهبود بخشد. کشت های قارچی در مجموع همانند بافر تنظیم کننده اسیدیته شکمبه بوده و می تواند سایر باکتری ها مانند سلنوموناس رومینانتیوم را به مصرف اسید لاکتیک ترغیب نماید. البته استفاده از پروبیوتیک هایی که از باکتری های پروپیونی باکتریوم ساخته شده است، می تواند تولید اسید لاکتیک و گلوکز را به ترتیب به اسید استیک و پروپیونیک تغییر دهد. در مجموع پروبیوتیک ها مصرفی می توانند در مدت زمان طولانی باعث پایداری اسیدیته شکمبه و فعالیت های پروتوزوئری شوند. ثبات در اسیدیته می تواند فعالیت ها و توسعه جمعیت میکروبی را افزایش دهد. همچنین، پروبیوتیک ها سبب افزایش آمونیاک شکمبه جهت افزایش توده میکروبی می شوند. دلیل بر این مدعا افزایش جریان پروتئین عبوری از شکمبه به مجرای روده می باشد. البته حضور آمونیاک می تواند دلیلی بر پایدار ماندن اسیدیته شکمبه و دی آمیناسیون بالای میکروبی تلقی گردد. تولید متان و گاز هیدروژن در مصرف پروبیوتیک به شدت تابع نوع میکروارگانیسم بکار رفته در مایه کوبی می باشد.

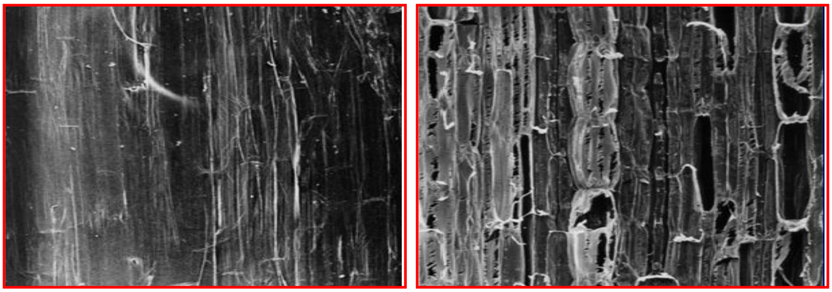
نهایتا استفاده از پروبیوتیک می تواند فرضیه جایگزینی صحیح و مطلوب باکتری های مورد نیاز را پس از یک دوره درمانی در دستگاه گوارش دام و طیور احیا نماید. بدین صورت که براساس نوع پروبیوتیک مصرف شده می توان غالبیت هضم مواد مغذی در شکمبه را تعیین و روند تخمیر و جمعیت میکروبی را تغییر داد. بطور مثال؛ با افزایش باکتری گرم مثبت هضم فیبر و با باکتری گرم منفی هضم مواد پر تراکم را افزایش می دهد. پروبیوتیک ها می توانند با حذف گونه های نامطلوب در مخزن تخمیر، حذف پراکسید هیدروژن و باکتریوسین ها، افزایش قابلیت هضم و جذب مواد مغذی، کنترل اسیدیته با تغییر تولیدات تخمیری و کنترل نرخ عبور بر تنوع زیستی میکروب ها موثر شوند. از آنجا که پروبیوتیک ها می توانند کشت های زنده میکروبی باشند، جمعیت میکروبی همواره توسط غالبیت میکروارگانیسم تلقیح شده تغییر می کند. اما، پایداری میکروارگانیسم تلقیح شده در شکمبه نکته مهم و قابل بررسی است که باید همواره مورد توجه محققین قرار گیرد. برای این پایداری لازم است سه اصل اساسی برای ورود گونه جدید میکروبی در نظر گرفته شود تا ادامه زندگی برای آنها بیمه شود. این سه اصل شامل: ۱- انطباق کامل محیط رشد میکروب تازه وارد با محیط شکمبه (از لحاظ معیارهای شیمیایی مانند فشار اسمزی، شرایط بی هوازی، تعادل آنیون-کاتیون و غیره و معیار فیزیکی مانند نرخ

عبور و غیره)، ۲- وجود مواد غذایی مورد نیاز میکروب تلقیح شده در محیط شکمبه و حضور مداوم آنها و ۳- فقدان روابط نامساعد با سایر میکروب های شکمبه که در مقدار و حجم وسیع تری حاضر می باشند.

از مشکلات اصلی تولید و مصرف پروبیوتیک ها دانش اندک درباره پیچیدگی های محیط شکمبه - روده و ناتوانی در شناسایی هزاران گونهٔ بالقوه که بر میکرواکولوژی آنها موثر هستند، می باشد . مطالعات فعلی بر روی تاثیر پروبیوتیک ها بر لاکتوباسیل ها، مخمرها و بیفیدوباکترها متمرکز شده است، در آینده باید این توجه به جمعیت های میکروبی بزرگتر که در تخمیر مواد مغذی مانند فیبر تاثیرگذار هستند، و ممکن است بر کارایی کلی پروبیوتیک ها نیز اثر داشته باشند، بسط پیدا کند.

۵-۳-۳-۸ آنزیم ها

آنزیم ها ترکیباتی پروتئینی هستند که بصورت طبیعی یافت می شوند. آنزیم ها در طی فرآیندهای شیمیایی بسیار اختصاصی عمل نموده و در انجام واکنش ها سرعت عمل را تا ۱۰۶ برابر سرعت طبیعی افزایش می دهند. با وجود آنکه آنزیم ها بر روی ترکیبات غذایی اثر می کنند، ولی بر روی میکروب های دستگاه گوارش تاثیری نداشته و مقاومتی در برابر آنها نشان نمی دهند. استفاده از آنزیم در تجزیه و تخمیر مواد غذایی این امکان را فراهم می سازد که بدون حضور گونه های میکروبی یا قارچی که برای فعالیت های زیستی شکمبه مضر می باشند و یا قدرت زندگی در شکمبه را ندارند، ماده غذایی خاصی را تخمیر و فعالیت مورد نظر را طراحی نمود. بطور مثال؛ قارچ های هوازی تخریب کنندگان مناسب لیگنین و ساختارهای مشابه آن می باشند، اما امکان فعالیت این قارچ ها در شکمبه وجود ندارد. لذا با تهیه آنزیم های خاص این گروه از میکروارگانیسم ها می توان فعالیت مزبور را در شکمبه انجام و تجزیه و توسعه فعالیت میکروبی را در روی مواد غذایی نامتعارف افزایش داد (شکل ۵-۸). همچنین از آنجا که شکمبه محل اصلی اثر آنزیم های افزوده شده به جیره دام ها محسوب می گردد، در صورت وجود مقاومت و پایداری آنزیم ها در اسیدیته و نرخ عبور شکمبه، این مواد برای مدت طولانی می توانند فعالیت خود را حفظ نمایند. پایداری در برابر تغییرات pH و سایر عوامل مانند مقاومت در برابر فعالیت های میکروبی و نرخ عبور به معنای توانایی یک آنزیم در فعالیت خود پس از یک تغییر موقت در اسیدیته، نرخ عبور ماده غذایی مصرفی و تغییرات جمعیت میکروبی می باشد. این ویژگی برای آنزیم هایی که باید در روده اثر خود را اعمال نمایند (بدون اینکه تجزیه پروتئولیتیک شوند)، از اهمیت خاصی برخوردار است. اما آزمایشات نشان می دهد که حداکثر ماندگاری آنزیم دریافت شده در شکمبه ۶ ساعت بعد از مصرف خوراک مصرفی حاوی آنزیم می باشد.



شکل ۵-۸ اثر آنزیم قارچ های هوازی بر تجزیه لیگنین در شکمبه (تصویر سمت راست مصرف لیگنین با آنزیم و سمت چپ مصرف لیگنین بدون آنزیم).

برای ارزانتر تمام شدن تولیدات آنزیمی جهت مصارف دامی بهتر است از منابع گیاهی و سپس میکروبی استفاده گردد. اگر چه آنزیم های متعددی در زمینه افزایش قابلیت هضم مواد مغذی در نشخوارکنندگان ساخته شده است، اما آنزیم ها عموما از چهار نوع باکتری به نام های باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*)، لاکتوباسیلوس پلانتروم (*Lactobacillus plantarum*) و استرپتوکوکوس فاسیوم (*Streptococcus faecium*) و پنج نوع قارچ به نام های آسپرژیلوس اوریزآ (*Aspergillus oryzae*)، آسپرژیلوس نیگر (*Aspergillus niger*)، تریکودرما ریسی (*Trichoderma reesei*)، تریکودرما لانجیبراچیاتوم (*Trichoderma longibrachiatum*) و ساکارومایسس سرویسه (*Saccharomyces cerevisiae*) تهیه می شوند. تحقیقات ارائه شده در ورود آنزیم به مواد مغذی نشخوارکنندگان بیشتر مربوط به تجزیه دیواره سلولی گیاهان (سلولز، همی سلولز و قندهای پلی ساکاریدی دیگر) مانند آنزیم های سلولاز و مجموعه آن، همی سلولازها و زایلانازها تمرکز یافته است. بعد از آنزیم های فوق توجهات بعدی صرف آنزیم های آمیلاز، پروتئیناز، پکتیناز و لیپاز شده است.

آزمایشات بیانگر آن است که مصرف آنزیم ها در خوراک دام سبب تجزیه بیشتر مواد مغذی و بالطبع افزایش جمعیت باکتری هایی که از مواد تجزیه شده استفاده می کنند، می شود. به طور منطقی استفاده از آنزیم هاضم فیبر سبب افزایش همکاری بین آنزیم ورودی و آنزیم های ترشح شده از باکتری ها می گردد. این افزایش قدرت تجزیه مواد فیبری را باید به شکل تصاعدی افزایش دهد. اما تحقیقات نشان می دهد که تلقیح آنزیم سبب کاهش فعالیت آنزیمی میکروب ها در هضم مواد غذایی می گردد. علت این کاهش می تواند کمیت و کیفیت پایین آنزیم های ترشح شده باکتری به دلیل هجوم آنزیم های مصرفی در شکمبه و یا کاهش جایگاه اتصال آنزیم (سلولوزوم ها) به مواد غذایی باشد. لذا برای تهیه یک آنزیم هاضم فیبر لازم است جایگاه فعالیت آن آنزیم بررسی شود و سپس از آنزیم هایی بیشتر

استفاده گردد که برای فعالیت تخمیری خود جایگاه خاصی مانند سلولوزوم نیاز نداشته باشند. در این زمینه دیده شده است که بعضی از آنزیم ها مانند آنزیم حاصل از قارچ آسپرژیلوس اوریزآ جمعیت میکروبی و فعالیت های آنزیمی هضم قند علوفه را بدون تصرف جایگاه تخمیر افزایش می دهد. این افزایش می تواند ناشی از شکستن باندهای فرولیک و کوماریلی باشد که در ساختار علوفه دیده می شود. با حذف پیوندهای نامطلوب کوماریلی و فرولیکی فعالیت میکروب ها افزایش می یابد. و یا افزایش آنزیم های حاصل از قارچ نئوکالیماستیکس و باکتری های فیبروباکتر سوکسینوژنز و بوتیرویبریو فیبروسولونس می تواند باندهای فنولیک اسید را تجزیه و فعالیت میکروبی و جمعیت آنها را گسترش دهند.

بکارگیری آنزیم های هاضم فیبر می تواند اسیدیته شکمبه را در حد مطلوب نگاه دارد. اما برای فعالیت این آنزیم ها لازم است pH شکمبه در دامنه ۶ تا ۶/۵ نگاه داشته شود. البته آنزیم های حاصل از قارچ های هوازی نیاز به اسیدیته ۴ تا ۶ برای فعالیت های تخمیری خود دارند. لذا بکارگیری نوع آنزیم می تواند براساس اسیدیته مورد نیاز فعالیت میکروب های شکمبه را تحت تاثیر قرار دهند. لذا این فرضیه می تواند کاهش توسعه آنزیم هاضم فیبر حاصل از قارچ تریکودرما لانجیبراچیاتوم را در اسیدیته ۵ تا ۵/۵ ناشی از مصرف مواد متراکم را در شکمبه و یا سیلاژها تفسیر نماید.

آنزیم ها می توانند با افزایش قابلیت هضم یک ماده غذایی بر نرخ عبور و میزان مصرف ماده خشک تاثیر مستقیم گذارده و آن را افزایش دهند. افزایش در مصرف خوراک سبب ازدیاد نرخ عبور مواد مغذی از شکمبه می شود. افزایش نرخ عبور می تواند براساس انطباق و یا عدم انطباق با سرعت رشد و تولیدمثل میکروب ها بر جمعیت آنها موثر گردد. در نهایت استفاده از آنزیم ها می تواند به دلیل افزایش قابلیت هضم بعضی از مواد مغذی که در شکمبه زمان لازم برای هضم آنها وجود ندارد، مناسب عنوان شود. همچنین، استفاده از آنزیم های غذایی می تواند به دلیل کاهش اثرات مخرب عوامل ضد تغذیه ای بعضی از مواد گیاهی مانند ترکیبات فنولی لیگنین در شکمبه مطلوب جلوه نمایند. اما استفاده بیش از حد آنزیم ها می تواند اثر منفی بر قابلیت هضم مواد مغذی داشته باشد. بطور مثال؛ افزایش مصرف آنزیم های فیبرولایتیک می تواند سطوح تماس باکتری های هاضم فیبر را کم و در نتیجه جمعیت میکروبی فعال را کاهش دهد. آنزیم ها در تغییر جمعیت میکروارگانیسمی به صورت غیر مستقیم و با افزایش هضم یک ماده غذایی عمل می کنند.

۶-۳-۳-۸ آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک ها گروهی از ترکیبات شیمیایی اند که به صورت بیولوژیکی توسط برخی از گیاهان و یا میکروارگانیسم هایی مانند قارچ تولید شده و خاصیت بازدارنده رشد باکتری ها را دارند. بررسی

تاریخچه استفاده از آنتی بیوتیک ها نشان می دهد که از زمان های بسیار دور خواص ضد باکتریایی برخی مواد شناخته شده بودند. مصارف آنتی بیوتیک در سه بخش (۱) دوزهای درمانی (۲) استفاده جهت پیشگیری و (۳) بعنوان محرک رشد خلاصه می گردد. استفاده از آنتی بیوتیک بعنوان محرک رشد در دوزهای کم و در یک دوره طولانی مدت کاربرد عصر امروز می باشد. آنتی بیوتیک ها برای افزایش راندمان مصرف خوراک و افزایش تولیدات دامی استفاده می شوند. دوز مصرفی باید از حداقل مقدار ممانعت کنندگی رشد میکروارگانیسم های مضر شناخته شده در دستگاه گوارش بیشتر باشد. البته مضر بودن میکروارگانیسم براساس کنترل فعالیت تخمیری و هدفمند کردن مسیرهای تخمیر انتخاب می شود. آنتی بیوتیک ها یا شبه آنتی بیوتیک ها به دو روش در جیره غذایی دام ها مشاهده می شوند.

- **طبیعی؛**

آنتی بیوتیک‌ها به دلیل ماندگاری در شیر و گوشت برای مصرف کننده ایجاد خطر می‌کند. استفاده دائم از آنتی بیوتیک ها می تواند مقاومت پاتوژن‌ها را در برابر مواد آنتی بیوتیکی افزایش داده و بهبود دام را در مواقع بیماری با سختی روبرو کند. بنابراین محققین به دنبال ترکیبات جایگزین با توانایی بهبود فرآیند تخمیر به شیوه آنتی بیوتیک ها می‌باشند. در حالت طبیعی می توان اسانس گیاهان و یا ترکیباتی مانند ایزوفلاون ها (موجود در گیاهان لگومینوزه) را که فعالیتی مشابه آنتی بیوتیک دارند، را پیشنهاد نمود. این دسته مواد شبه آنتی بیوتیکی در اکثر مواقع همان فعالیتی را از خود بروز می دهند که آنتی بیوتیک ها نشان می دادند. در این زمینه تحقیقاتی بر روی اسانس گیاهان مختلفی مانند دارچین، آویشن شیرازی، فلفل سیاه، زیره سبز، زیره سیاه، زردچوبه، رزماری، پوسته پسته، گیشنیز، رازیانه، پونه، انواع نعناع، شوید، سیر و موسیر، پوسته مرکبات، ریحان، بادیان رومی، پرک هندی، زنجبیل، پوسته انار و غیره آغاز شد. نتایج اولیه آزمایشات نشان داده است که اسانس‌های طبیعی گیاهان می توانند بازدهی تخمیر را افزایش و تولید گاز متان را در شکمبه نشخوارکنندگان (۵۰ درصد توسط فلفل سیاه و پونه کوهی و ۷۰ درصد توسط دارچین و آویشن شیرازی) کاهش دهند. اسانس ها می توانند جمعیت میکروب های شکمبه را دستخوش تغییر قرار داده (اسانس گیشنیز می تواند فعالیت و رشد باکتری بوتیری ویبریوفیبروسولونز را نسبت به شاهد در دام های بالغ افزایش دهد) و با کمک آنها مانند اسانس دارچین و زیره سبز فعالیت باکتریایی داخل شکمبه گوساله های شیرخوار را که منجر به اسهال می شوند را پاک سازی نمود. اسانس ها می توانند بر قابلیت هضم خوراک و مصرف بیشتر مواد غذایی موثر بوده و سبب افزایش نرخ عبور شوند. با تغییر معیارهای فوق می توان جمعیت میکروب ها را تغییر داد. همچنین دسته ای از اسانس ها می توانند تولید آمونیاک را کاهش و فعالیت دی آمیناسیون را متوقف و

پروتئین حقیقی را عبور نماید. و یا اسانس گیاهانی مانند آویشن، فلفل، زیره سبز، رازیانه و نعناع می توانند به شدت اسیدیته شکمبه را کنترل و بار اسیدی را کاهش دهند.

فلاونوئیدها که جزء ترکیبات پلی فنولیکی طبقه بندی می شوند، دارای هفت گروه شامل: *Flavanones, Flavones, Isoflavonoids, Anthocyanins, Flavanonols, Flavanols, Flavonols* می باشند. این ترکیبات در گیاهان براساس شرایط محیطی کم یا زیاد می شوند. اگر چه مقدار فلاونوئیدها در گیاهان زیاد نمی باشد، اما به دلیل خواص ضد میکروبی شدید آنها از اهمیت خاصی برخوردار هستند. فلاونوئیدها می توانند در مقابل تمامی باکتری های گرم مثبت واکنش تهاجمی نشان داده و حذف آنها را منجر شوند. اما از طرف دیگر می تواند فعالیت های پروتوزوئرها مژک دار را گسترش داده و جمعیت آنها را بهبود بخشد. ترکیبات فلاونوئیدی به شدت فعالیت باکتری های متان ساز را مختل و کشنده انها می شوند. با مرگ این باکتری ها و افزایش فعالیت های پروتوزوئری (سبب مرگ سایر باکتری ها می شوند) میزان آمونیاک تولیدی در شکمبه افزایش می یابد. همچنین، فلاونوئیدها می توانند بطور اخص اجازه فعالیت باکتری های سلولایتیک را ارائه نموده و جمعیت آنها را بدون رقیب گسترش دهند. فعالیت های هضم فیبر توسط فلاونوئیدها بهبود یافته و می توانند همانند یونفرها سبب ابقای انرژی بیشتر در باکتری ها شوند. علاوه بر موارد فوق ترکیبات فلاونوئیدی می تواند بعنوان یک حامی فعالیت موننسین را بهبود بخشد.

- **مصنوعی؛**

موارد استفاده از آنتی بیوتیک جهت دستکاری فعالیت های زیستی شکمبه متنوع می باشد. اما همگی از یک اصل ممانعت از رشد میکروارگانیسم ها تبعیت می کنند. طیف مقاومت میکروارگانیسم ها در برابر آنتی بیوتیک ها متنوع و مقاومت میکروب ها براساس ساختار غشای سلولی صورت می گیرد. استفاده از آنتی بیوتیک ها به دلیل بوجود آمدن سویه های مقاوم و امکان انتقال این مقاومت به سایر موجودات، ماندگاری بقایای دارویی در تولیدات و تغییر نامطلوب گونه های میکروبی دستگاه گوارش مشکلاتی را فراهم ساخته است. هم اکنون در بعضی از کشورها استفاده از آنتی بیوتیک درخوراک دام و طیور بشدت محدود شده است. آنتی بیوتیک های مصرفی در تغذیه دام متنوع بوده و مهمترین آنها شامل ویرجینیامایسین (*Virginiamycine*)، فلاومایسین (*Flavomycine*)، آووپارسین (*Avoparcine*)، اکتینومایسین (*Actinomycine*)، اورمایسین (*Auremycine*)، سالینومایسین (*Salinomycine*)، ناراسین (*Narasin*)، تایلوزین (*Tylosin*)، اریترومایسین ها (*Erythromycine*)، پنی سیلین جی (*Penicillin G*)، کلروتتراسایکلین ها (*Chlortetracycline*)، ترامایسین

(*Tetramycine*)، وانکومایسین (*Vancomycine*) و نئومایسین (*Neomycine*) می باشد، که اکثر آنها در تغییر جمعیت و گونه های میکروبی قابلیت های خاصی دارند.

آنتی بیوتیک ها می توانند با تاثیر مستقیم بر روی میکروارگانیسم های هدف بر تخمیر و جمعیت آنها موثر واقع شوند. این تاثیر حتی بر جمعیت پروتوزوئرها و گاهی خود قارچ ها قابل مشاهده است. آنتی بیوتیک ها علاوه بر کنترل ورود و خروج یون های حیاتی می توانند باعث تخریب غشای سلولی میکروب ها شوند. مدت زمان مصرف و میزان آنتی بیوتیک مصرفی بر فرآیندهای تخمیر و جمعیت میکروب ها اهمیت بسزایی دارد. بطور مثال؛ استفاده از مقدار متوسط ویرجینیامایسین سبب بهبود اسیدیته شکمبه می شود. اما با افزایش مقدار مصرف این بهبودی با تاخیر رخ می دهد و یا تاثیری نخواهد داشت. ویرجینیامایسین سبب افزایش اسید پروپیونیک در مقابل اسید استیک می گردد. با افزایش مقدار ویرجینیامایسین مصرفی اسید پروپیونیک بیشتری تولید خواهد شد. در صورت بکارگیری آنتی بیوتیک مزبور در حد متوسط میزان آمونیاک تولیدی به سبب افزایش فعالیت باکتری های پروتئولایتیک افزایش یافته و با افزایش مقدار مربوطه میزان آمونیاک تولیدی در حد بالایی کاهش می یابد. همچنین، ویرجینیامایسین سبب کاهش جمعیت باکتری های استرپتوکوکوس و کلیه باکتری های گرم مثبت شده و فعالیت باکتری های لاکتوباسیلوس و دسته ای از پروتوزوئرها را افزایش می دهد (جدول ۴-۸). ویرجینیامایسین سبب کاهش فعالیت های پروتئولایتیکی باکتری ها می شود.

جدول ۴-۸ اثر مقدار ویرجینیامایسین بر جمعیت پروتوزوئرها.

نام پروتوزوئر	مقدار متوسط (۱۷۵ میلی گرم در روز)	مقدار بالا (۲۵۰ میلی گرم در روز)	اثر مقدار بالا در مقابل مقدار متوسط
داسی تریشیا	+	+	-
ایزوتریشیا	-	+	+
انتودینیوم	+	+	+
اوستراکودینیوم	-	+	+
متادینیوم	+	-	-
اوفری اسکولکس	+	+	+
پلی پلاسترون	-	+	+

از طرف دیگر، آنتی بیوتیک آووپارسین قادر به حذف باکتری های گرم مثبت می باشد. در حالیکه باکتری های گرم منفی کوکوباسیلی یا میله ای کوتاه پس از عادت پذیری در مقابل این آنتی بیوتیک مقاوم بوده و به علت کاهش میکروارگانیسم های رقیب گسترش بیشتری خواهند داشت. بدین ترتیب آووپارسین سبب ازدیاد باکتری های سلولایتیک مانند باکتروئیدس سوکسینوژنز، رومینوکوکوس

آلبوس، رومینوکوکوس سوکسینوژنز و رومینوکوکسی ها می شود. لذا در حضور آووپارسین تولید اسید استیک و سوکسینات بدون ازدیاد هیدروژن و اتیل الکل افزایش می یابد. بر این اساس آنتی بیوتیک مزبور می تواند تولید متان را به شدت کاهش دهد. علاوه بر آنتی بیوتیک های فوق، فلاوومایسین غلظت آمونیاک و اسیدهای چرب فرار شکمبه به جز کاپروئیک و والریک اسید را کاهش و بر نسبت اسید استیک به پروپیونیک بی تاثیر می باشد. فلاوومایسین ها بر باکتری های گرم مثبت سم محسوب شده و بر باکتری های گرم منفی و پروتوزوئرها تقریبا بی تاثیر می باشد. این آنتی بیوتیک در بعضی از موارد فعالیت باکتری های سلولایتیک را افزایش داده است.

باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک مانند لاکتوباسیلوس ها، بیفیدوباکتریاها و استرپتوکوکوس بویس ها در مقابل آنتی بیوتیک ها بخصوص آووپارسین، ناراسین، تایلوزین، سالینومایسین و ویرجینیامایسین حساس بوده و فعالیت آنها متوقف می شود. اما باکتری های مصرف کننده اسید لاکتیک به نام های مگاسفرا السدنی، سلنوموناس لاکتی لایتیکا (*Selenomonas lactilytica*) و سلنوموناس رومینانتیوم به آنتی بیوتیک های اشاره شده حساس و باکتری آنایروویبریو لیپولایتیکا به ناراسین و سالینومایسین و باکتری ویلونلا الکانسس (*Veillonella alcalescens*) به ویرجینیامایسین و تایلوزین حساس می باشند. همچنین، باکتری های تولید کننده اسید سوکسینیک مانند باکتروئیدس آمیلوفیلوس، باکتروئیدس رومینوکولا، باکتروئیدس سوکسینوژنز، سلنوموناس لاکتی لایتیکا، سوکسینوموناس آمیلولایتیکا، و سوکسینوویبریو دکسترینوسولونس و سلنوموناس رومینانتیوم به آنتی بیوتیک های فوق مقاوم بوده و اسپیروکت ها و ترپنوما بریانتی (*Treponema bryantii*) در این دسته از باکتری ها به آنتی بیوتیک های فوق حساس می باشند. در ادامه آزمایشات انجام شده مشخص گردید که باکتری های تولید کننده اسید بوتیریک هم بجز باکتری مگاسفرا السدنی در برابر آنتی بیوتیک های فوق حساس هستند. در نهایت با تزریق هر یک از آنتی بیوتیک های اشاره شده می توان تغییر روند تخمیر و جمعیت گونه های باکتریایی و پروتوزوئری را حتمی نمود.

۷-۳-۳-۸ اسیدهای آلی

استفاده از اسیدهای آلی در نگهداری یک ماده غذایی تاریخچه طولانی دارد. اما بکارگیری آنها در کنترل تخمیر و جمعیت میکروبی وابسته به آن تنها ۲۰ تا ۲۵ سال است که قدمت دارد. درباره استفاده اسیدهای آلی در تغییر تنوع میکروبی اتفاق نظر مشاهده نمی شود. ولی امروزه مشاهده شده است که اسیدهای آلی می توانند از اهمیت خاصی در تغییر گونه های میکروبی شکمبه و محدود کردن بعضی از آنها برخوردار باشند. مهمترین و رایج ترین اسیدهای آلی خالص بکار گرفته شده در تغییر گونه های میکروبی و فعالیت های تخمیری اسید مالیک، فوماریک و آسپارتیک می باشد. مالیک و فوماریک

اسید (دی کربوکسیلیک اسید چهار کربنه) در بافت های گیاهی به وفور یافت می شوند. این دو اسید آلی در چرخه اسید سیتریک در مسیر ساخت سوکسینات-پروپیونات باکتری ها اهمیت فراوانی دارند. اسید آسپارتیک هم یک آلفا-آمینو دی کربوکسیلیک محسوب می شود. اسیدهای آلی می توانند جمعیت باکتری های آمیلولایتیک را افزایش داده و فعالیت باکتری های متان ساز را کاهش می دهند. تاثیر اسیدهای آلی بر تخمیر شکمبه و جمعیت گونه های میکروبی به مقدار و مدت زمان مصرف آنها در جیره غذایی دارد. این اسیدها می توانند در مجموع سبب افزایش pH، کل اسیدهای چرب فرار، پروپیونات و بوتیرات می شود. البته در بعضی از آزمایشات بکارگیری اسیدهای آلی سبب افزایش غلظت آمونیاک شکمبه شده و تولید اسید لاکتیک و گاز متان را کاهش می دهد. با استفاده از این اسیدها در جیره غذایی می توان مصرف ماده خشک و نرخ عبور مواد غذایی را افزایش داد.

در کنار اسیدهای آلی فوق الذکر می توان به طور مستقیم از اسیدهای چرب فرار آلی تولید شده در فرآیندهای تخمیر بی هوازی خارج از شکمبه مانند اسید استیک، پروپیونیک، بوتیریک، والریک، لاکتیک، ایزوبوتیریک و ایزووالریک موجود در مواد سیلویی استفاده نمود. همواره جیره بر تراکم اسیدهای چرب فرار و جمعیت میکروبی موثر بوده و تغییر آن بر افزایش یا کاهش یک اسید چرب و گونه میکروبی موثر می باشد. اما در هنگام استفاده از اسیدهای آلی مذکور روند تغییرات اسیدهای چرب فرار کاملا با روش تغییر اقلام جیره متفاوت است. با استفاده هر یک از اسیدهای چرب احتمال کاهش جمعیت یک گونه میکروبی بیشتر شده و حتی احتمال حذف گونه میکروبی هم می باشد. بطور مثال؛ استفاده از اسید لاکتیک می تواند فعالیت اکثر گونه های سلولایتیک و اندکی از گونه های آمیلولایتیک را با خطر حذف روبرو نماید. تزریق اسیدهای چرب فرار به شکمبه ابتدا با تغییر اسیدیته و سپس با غلظت اسیدهای چرب فرار از رشد و توسعه بعضی از گونه های میکروبی جلوگیری می کنند. اسیدیته مطلوب برای فعالیت میکروب ها بین ۵/۸ تا ۷ متغیر می باشد. در pH زیر ۵ ابتدا باکتری های سلولایتیک و سپس آمیلولایتیک متوقف می شوند. لازم به توضیح است که پروتوزوئرها در اسیدیته بالای ۵ ناپدید می گردند. لذا با افزایش مصرف اسیدهای چرب فرار بخصوص اسید لاکتیک، اسید پروپیونیک و سپس استیک و بوتیریک اسیدیته شکمبه افزایش و فعالیت میکروبی مختل می شود. از طرف دیگر، غلظت اسیدهای چرب فرار بطور ایده آل در شکمبه بین ۶۰ تا ۱۰۰ میلی مول به ازای هر لیتر مایع شکمبه (اسید استیک ۴۰ تا ۷۰ ، اسید پروپیونیک ۱۰ تا ۲۰ و اسید بوتیریک ۵ تا ۱۰ میلی مول به ازای لیتر) است. حال افزایش اسید استیک به بیش از حد معمول (بالای ۶۰ میلی مول در لیتر) از رشد باکتروئیدس رومینوکولا جلوگیری می نماید. این افزایش سبب کاهش ۳۰ درصدی فعالیت باکتری های تولید کننده اسید استیک و افزایش فعالیت باکتری های تولید کننده اسید پروپیونیک می شود. و یا

افزایش اسید پروپیونیک بیش از حد معمول رشد گونه ویلونلا آلکانسس و مگاسفرا السدنی که مصرف کننده لاکتات می باشند، جلوگیری می نماید. لذا در هنگام مصرف اسیدهای چرب فرار آلی این نکته حائز اهمیت است که علاوه بر کاهش جمعیت میکروبی تولید کننده همان اسید چرب مصرفی، احتمال کاهش گونه های دیگر میکروبی و بالطبع کاهش قابلیت هضم ماده غذایی افزایش می یابد. پس در هنگام مصرف این اسیدها در بعضی از خوراک مانند سیلوها لازم است حد تعادل مصرف و کیفیت آنها را بررسی و از تغییرات نامطلوب گونه های میکروبی جلوگیری نمود.

۸-۳-۴ دستکاری براساس ورود سموم مصرفی

به دلیل ازدیاد دام ها و کمبود خوراک جهت تغذیه آنها، در سال های اخیر دام ها از مواد غذایی مختلفی استفاده می کنند که از تولیدات فرعی صنعتی و کشاورزی مشعب شده اند. این مواد همراه با بعضی از گونه های گیاهی حاوی مواد ضد تغذیه ایی هستند که بر جمعیت گونه های میکروبی و فعالیت های تخمیری اثر بسزایی دارند. این ترکیبات ضد تغذیه ایی می توانند مستقیما بر میکروارگانیسم و یا فعالیت هایی تخمیری اثر نمایند. برای کنترل اثرات مواد ضد تغذیه ایی موجود اگر چه راه کارهای فراوانی ارائه شده است که می تواند به عنوان استراتژی های حذف سموم مورد بررسی قرار گیرند، اما بهتر است که از ورود این سموم صنعتی و کشاورزی به شکمبه تا حد امکان جلوگیری شود.

۸-۳-۴-۱ ترکیبات ضد تغذیه ایی گیاهی

گیاهان دارای یکسری تنوعات شیمیایی ضد تغذیه گسترده ای هستند که تاثیرات شگرفی بر فعالیت های تخمیری، فعالیت های دامی و گونه های میکروبی شکمبه می گذارند. مواد ضد تغذیه ایی در گیاهان صرفا عامل مقاومت گیاه در برابر عوامل نامساعد طبیعی مانند خشکسالی، سرمای طاقت فرسا، گرمای شدید، چرای بی رویه دام ها و سایر موارد می باشد. ذکر همه عوامل ضد تغذیه ای گیاهان خارج از توان بحثی این کتاب است. اما مهمترین آنها که در بخش قبلی بصورت اختصار توضیح داده شده است، شامل ۱- فنیل پروپانوئیدها (مانند لیگنین، فلاوون ها، کومارین ها، ایزوفلاوون ها، تانن های متراکم شده، تانن های قابل هیدرولیز و غیره)، ۲- مواد نیتروژن دار آلکالوئیدی و ترپنوئیدی، ۳- لیپوفیلیک ترپن ها (مانند روغن های ضروری، ساپونین ها، استروئیدها، لاتکس، کائچو و غیره)، ۴- لیپیدهای محدود کننده (کوتین ها، واکس ها، سوبرین ها و غیره)، ۵- محدود کننده های پروتئازی (لکتین ها، هموگلوتنین ها و غیره) و ۶- سیلیکاها که در قالب محصولات بیوژنیک مشاهده می شوند، طبقه بندی می شوند. حیوانات علفخوار بطور طبیعی از مصرف گیاهان سمی یا غیر متعارف اجتناب می کنند، مگر آنکه به آنها فشار غذایی وارد شود. البته باید عنوان کرد که به دلیل تنوع میکروبی شکمبه،

دام می تواند بطور تقریبی بر مسمومیت های ایجاد شده فائق آیند. مهمترین مواد ضد تغذیه ایی گیاهی رایج در دنیا عبارتنداز:

• **لیگنین؛** اگر چه لیگنین یک ترکیب انرژی زا در جیره های فیبری می باشد، اما از دید تغذیه ایی می تواند سمی برای میکروارگانیسم تلقی گردد. لیگنین همواره یک معمای ساده ولی در نوع خود پیچیده برای محققین تغذیه می باشد. لیگنین یک کربوهیدرات ساختاری نیست، بلکه از بقایای فنیل پروپان شکل گرفته است. مهمترین ترکیب اصلی لیگنین از گروه های فنولی شکل گرفته است. سه زنجیره غذایی که در ملکول لیگنین فراوان یافت می شوند شامل الکل های کوماریل، کونیفریل و سیناپیل می باشد. ترکیبات اشاره شده از اسیدهای آمینه مانند فنیل آلانین و تیروزین ساخته می شوند. لیگنین وظیفه ای همچون سیمان برای استحکام گیاهان دارد که برحسب شرایط منطقه ساختار متفاوت دارد. بدلیل ساختارهای متفاوت این ترکیب مبارزه با آن سخت می باشد. همانطور که در مباحث پیشین اشاره شده است در بین میکروارگانیسم ها فقط قارچ های هوازی قابلیت تخریب کامل آن را دارند. البته باکتری های بی هوازی وجود دارند که ترکیبات حلقوی آروماتیک لیگنین را خرد می کنند. اما زمان کافی برای این کار در شکمبه وجود ندارد. لیگنین به شدت بر دو محور اساسی روی اکولوژی شکمبه موثر خواهد بود. (۱)- الکل های موجود در لیگنین دارای اثر مهار کنندگی روی فعالیت های میکروبی شکمبه می باشد. الکل های حاصل از تخریب ساختار لیگنین می تواند غشای سلولی میکروب را متلاشی نماید. همچنین ترکیبات فنولی موجود در ساختار لیگنین عامل منفی در هضم مواد مغذی محسوب می شود. (۲)- لیگنین می تواند با ایجاد پوششی فعالیت باکتری های فیبرولایتیک را کاهش داده و هضم را با اختلال روبرو نماید. لیگنین از طریق اسید فرولیک که محدود کننده هضم مواد مغذی می باشد، با سلولز و همی سلولز متصل می شود. با مصرف گیاهان حاوی لیگنین گونه های میکروبی شکمبه به سمت باکتری های هاضم فیبر تمایل یافته و در بین باکتری های مزبور گونه های رومینوکوکوس و باکتروئیدس بیشترین تراکم را خواهند داشت. البته در کنار باکتری های مزبور فعالیت قارچ نئوکالیماستیکس بخصوص گونه فرونتالیس مشهود و مهم می باشد. با مصرف لیگنین، فعالیت باکتری های متان ساز جهت ساخت گاز متان افزایش یافته و اسیدیته کاهش می یابد. همچنین، با مصرف لیگنین تولید آمونیاک و پروتئین میکروبی در شکمبه افزایش یافته و اسیدهای چرب فرار از تولید پروپیونیک به سمت استیک بیشتر تغییر می یابد.

• **تانن ها؛** ترکیبات فنولیکی با وزن ملکولی بالا (۵۰۰ تا ۳۰۰۰) که براحتی در آب حل می گردند. این ترکیب می تواند با مواد مغذی بخصوص پروتئین ترکیب و با ایجاد خواص ژلاتینی باعث عدم هضم و عبوری شدن آنها از شکمبه می گردد. تانن ها جزء ترکیبات ثانویه در متابولیت های گیاهی محسوب

می شوند. تانن ها براساس ساختار شیمیایی و زنجیره ترکیبات فنولیک به دو گروه تانن های قابل هیدرولیز و فشرده طبقه بندی می شوند. تانن های قابل هیدرولیز عموما از استرهای گالیک اسید؛ Galic acid (گالوتانن ها) یا اسید الاجیک؛ Ellagic acid (الاجی تانن ها) با یک قند مرکز که بیشتر گلوکز می باشد، ساخته شده اند. این نوع تانن توسط اسید و یا آنزیم های داخل شکمبه قابل شکستن و تخمیر می باشد. در حالیکه تانن های متراکم که از فشرده شده پلیمرهای پروآنتوسیانیدین تشکیل شده اند، در شکمبه غیر قابل تجزیه بوده و به شدت بر روی گونه های میکروبی شکمبه موثر می باشند. اگر چه دسته ای از تانن ها می توانند به دلیل ایجاد بو و طعم مناسب سبب افزایش اشتهایی حیوان شوند، اما به طور ویژه از تخمیر فیبر جلوگیری نموده و باکتری های فیبرولایتیک را کاهش می دهند. بطور مثال؛ مشاهده شده است که با استفاده از گیاه *Calliandra calothyrsus* که حاوی تانن بالا بوده می توان جمعیت گونه های رومینوکوکوس و فیبروباکترها را به شدت کاهش داد. البته در این آزمایش مشخص گردید که جمعیت قارچ ها، پروتوزوئرها و باکتری های هضم کننده پروتئین تحت تاثیر تانن ها حذف و یا به شدت کاهش یافته اند. البته تانن ها بر گونه پروتوزوئری انتودینومورف ها بی تاثیر می باشد. همچنین، مشخص گردید بزهایی که از آکاسیا (*Acacia nilotica*) مصرف کرده بودند، تعداد جمعیت میکروب های شکمبه آنها به شدت کاهش یافته است. تانن های فشرده موجود در اسپرس (گونه *Onobrychis viciifolia*) می تواند فعالیت باکتری های هضم کننده پروتئین مانند بوتیرویبریو فیبرسولونس و استرپتوکوکوس بوویس را متوقف نماید. اما تانن فشرده اسپرس نتوانست بر روی رشد باکتری پروتلا رومینوکولا و رومینوباکتر آمیلوفیلوس موثر واقع شود. البته محققین توانستند دو باکتری گرم مثبتی را در شکمبه شترها و بزهایی که از ترکیبات تانن به مدت طولانی بهره برده بودند (در مناطق گرمسیری که گیاهان تانن بالایی دارند)، جدا نمایند که بر روی ترکیبات تانن موجود در آکاسیا و اسپرس رشد نماید. این باکتری ها به نام استرپتوکوکوس کاپرینوس (*Streptococcus caprinus*) و سلنومونا‌س رومینانتیوم می باشد. اگر چه جمعیت این باکتری ها در شکمبه اکثر دام ها فراوان نمی باشد، اما در شکمبه بزها توانسته بود به جمعیت ۲×۱۰^{۶} در هر میلی لیتر مایع شکمبه برسد. البته این گونه مقاوم در حد گسترده ای درگوسفند و گوزن ها مشاهده شده است. استفاده از جیره حاوی ترکیبات قندی محلول می تواند رشد و توسعه گونه های مقاوم به تانن را افزایش دهد. در ادامه تحقیقات محققین گونه های مقاومی از استرپتوکوکوس بخصوص گونه بوویس (*S. bovis*) و گالولایتیکوس (*S. gallolyticus*) را شناسایی نموده و آن را جهت جلوگیری از مسمومیت تانن توصیه نمودند. البته بعضی از گونه های بوتیرویبریو و لاکتوباسیلوس در طولانی مدت در مقابل تانن ها مقاوم می شوند. تانن ها علاوه بر ترکیبات شیمیایی خطرناک برای میکروارگانیسم ها می توانند با ایجاد یک لایه از تماس

میکروارگانیسم ها به مواد فیبری ممانعت ایجاد کرده و تخمیر فیبر را با مشکل روبرو کند. با کاهش هضم فیبر تولید اسید استیک کاهش یافته و اسید پروپیونیک افزایش می یابد. با کاهش هضم فیبر در شکمبه به دلیل حضور تانن تولید متان نیز کاهش می یابد. این کاهش می تواند ناشی از کاهش مواد اولیه ساخت متان و یا به خاطر کاهش فعالیت باکتری های متان ساز در حضور تانن صورت گرفته باشد.

• **ساپونین ها؛** دومین عامل ضد تغذیه ایی تولید شده در گیاهان محسوب می شود. ساپونین یک ترکیب گلیکوزیدی با خواص استروئیدی و ترپنوئیدی است که با قندها از طریق پیوندهای آب دوست آگلیکون؛ Aglycone (ساپوجنین) که اغلب اوقات غیراشباع می باشند، اتصالاتی دارند. ساپونین در خون دام می تواند عامل همولیز گلبول های قرمز گردد. ساپونین ها دارای ترکیبات متنوعی بوده و در ساختار لگوم ها به وفور یافت می شوند. اگر چه میکروارگانیسم های شکمبه در مقدار کم قابلیت تخریب ساپونین را دارند، اما در صورت ازدیاد آنها می تواند برای دام و میکروارگانیسم سم محسوب گردد. به دلیل وجود ساختار متنوع شیمیایی، این دسته از مواد آثار متفاوتی در شکمبه از خود بروز می دهند. ساده ترین آثار قابل مشاهده ایجاد نفخ و تغییر تولیدات تخمیری حاصل از آن می باشد. معروف ترین ساپونین موجود در گیاهان بخصوص گروه یوکا، سارساپونین ها (مجموعه ای از گلیکوزیدهای استروئیدی هستند) می باشد. این گروه از ساپونین ها در گیاهان مناطق کویری و گرمسیری که تحت چرای مداوم دام قرار می گیرند، دید می شود. با همه تنوعات، ساپونین ها دارای خواص مشترک ضد میکروبی بخصوص برای گروه پروتوزوئرهای مژک دار می باشند. اما درباره اثرات ضد باکتریایی مانند تغییر فعالیت باکتری های هضم کننده فیبر (به ویژه سلولایتیک ها) و باکتری های هضم کننده پروتئین نتایج نامتشابهی ارائه می شود. اما در مجموع می تواند فعالیت سلولایتیک و پروتئولایتیک را کاهش دهند. بطور مثال؛ ساپونین بر روی فعالیت باکتری های سلولالیتیک رومینوکوکوس آلبوس و فلاووفاسینس اثر کاهنده داشته ولی بر روی فعالیت فیبروباکتر سوکسینوژنز بی اثر می باشد. ساپونین ها با کاهش جمعیت پروتوزوئری سبب افزایش پروتئین خروجی از شکمبه می شوند. به دلیل توقف فعالیت های دی آمیناسیون در شکمبه به دلیل انباشته شدن ساپونین، تراکم نیتروژن آزاد و آمونیاک شکمبه کاسته می شود. همچنین، ساپونین ها بر جمعیت باکتری های متان ساز اثر کاهنده داشته و توقف فعالیت متان زایی را در بر خواهد داشت. اما فعالیت قارچی در اثر ورود ساپونین افزایش یافته و توده میکروبی گسترده ای را تشکیل می دهند. علاوه بر موارد فوق، ساپونین بر روی فعالیت باکتری های آمیلولایتیک و اسیدیته شکمبه تاثیر معنی داری ایجاد نخواهند کرد. همچنین، بر روی فعالیت استرپتوکوکوس بوویس و بوتیرویبریو فیبروسولونس اثر توقف کننده داشته و بر فعالیت سلنوموناس رومینانتیوم بی تاثیر می باشد. در ادامه، استفاده از مواد ساپونین دار در جیره می تواند نسبت اسیدهای

چرب فرار را تغییر و اجزای آن را کاهش یا افزایش دهد. بطور مثال؛ ساپونین در شکمبه سبب کاهش نسبت اسید استیک به پروپیونیک می گردد. اما در نهایت همه تغییرات ایجاد شده در فرآیندهای تخمیر و جمعیت های میکروبی براساس حضور ساپونین به میزان مصرف، نوع ساختار شیمیایی ساپونین، مدت زمان مصرف (جهت عادت پذیری دام و میکروارگانیسم ها)، نوع میکروارگانیسم های فعال شکمبه و ترکیب اقلام جیره مصرفی وابسته می باشد. لذا براساس فرضیه فوق اثرات مصرف ساپونین می تواند به شدت متغیر باشد.

● **نیترات و نیتریت؛** عوامل مرگ آوری برای دسته ای از میکروارگانیسم ها و حتی دام ها محسوب می گردند، که در شکمبه براساس افزایش خوراک غله ایی حاوی نیترات و نیتریت بخصوص سورگوم، جو، ذرت و گندم آشکار می شوند. غلظت نیترات در گیاهان بستگی به تولید و توزیع ماده خشک در گیاه دارد. عموما برگ ها و دانه ها غلظت های بسیار کمتری از نیترات را در مقایسه با ساقه و کاه دارند. در مقایسه با گیاهان جوان و گیاهان چند ساله و مسن تر مقدار نیترات کمتری را در خود دارند. علوفه های خشک بیش از ۸۰ درصد نیترات خود را در ۳۰ دقیقه ابتدایی ورود به شکمبه آزاد می کنند. در حالیکه این مقدار برای علوفه های تازه رطوبت دار ۳۰ درصد است (وقتی علوفه ای سیلو می شود از مقدار نیترات آن ۳۰ تا ۱۰۰ در صد کاهش می یابد). نیترات (NO_3) با تغییر به نیتریت (NO_2) سریعا جذب خون شده و می تواند اثرات مخرب خود مانند ایجاد مت هموگلوبین ناشی از اکسیده شدن اکسی هموگلوبین را آغاز نماید. ساعات اندکی پس از ورود نیترات به شکمبه به بیش از ۲۵ درصد آن توسط نیترات ردوکتاز باکتریایی به نیتریت تبدیل می شود. برای کاهش سمیت نیتریت، نشخوارکنندگان مسیر تبدیلی نیتریت به آمونیوم را طی می کنند. آمونیوم قدرت سمی بسیار کمتری در مقایسه با مواد فوق دارد. اما سرعت تبدیل شدن نیتریت به آمونیوم به عواملی مانند جمعیت میکروارگانیسم های شکمبه، فعالیت های آنزیمی خاص مانند نیترات رودکتاز، اسیدیته (تراکم یون هیدروژن) و سایر معیارهای کنترلی تخمیر انرژی در حد مکفی وابسته می باشد. آزمایشات نشان می دهد که با افزایش فعالیت باکتری های آمیلولایتیک و مصرف قندهای محلول می توان از طریق تولید فورمات، پیروات، لاکتات و گلیسین سمیت این ماده را در شکمبه کاهش داد. باکتری ویونلا آلکالسنس با مصرف لاکتات، نیترات را به نیتریت تبدیل می کند. مصرف بالای نیترات در طولانی مدت و به صورت پلکانی گونه های میکروبی غالب شکمبه را به سمت حضور باکتری های سلنومونادها، آنایرووبیریوها، انتروباکترها، لاکتوباسیلی ها و باکتری های مصرف کننده لاکتات پیش می برد. اگر چه در زمان مصرف بالای نیترات و نیتریت جمعیت باکتری های آمیلولایتیک جهت کاهش این سمیت لازم الاجرا می باشند. اما گزارشات ارائه شده نشان می دهد که با افزایش نیترات اسید استیک و فعالیت

باکتری های سلولایتیک افزایش یافته و بوتیرات نیز کاهش می یابد. همچنین، به دلیل مصرف واحدهای احیاء کننده توسط میکروب ها برای احیای نیترات به آمونیوم، تولید متان به دلیل فقدان واحدهای احیاء کننده کاهش می یابد. افزایش اسید استیک و نسبت آن در مقابل کاهش سایر اسیدها می تواند ناشی از دو عامل اساسی یعنی کاهش اسیدیته و نرخ رقت در شکمبه باشد. بدین صورت که انباشته شدن نیترات و نیتریت pH را به سمت خنثی تا قلیا پیش برده و فعالیت باکتری های آمیلولایتیک را که در اسیدیته ۵/۲ تا ۶/۲ بهترین رشد را دارند، متوقف نماید. از طرف دیگر، سطوح مصرف مواد غذایی با افزایش نیترات و نیتریت کاهش یافته و مواد غذایی مدت زمان طولانی تری در شکمبه باقی خواهند ماند. کاهش نرخ رقت (به دلیل تاثیر نیتروژن بر فعالیت فیزیکی شکمبه) می تواند عامل دومی در افزایش تولید اسید استیک محسوب گردد. افزایش نیترات در شکمبه می تواند فعالیت باکتری های پروتئولایتیک را متوقف کرده و عامل توقف دهنده آنزیم اوره آز در شکمبه می شود. لذا نیترات آزاد سازی آمونیاک در شکمبه را محدود می کند. اما این آزادسازی محدود شده که از مسمومیت آمونیاکی جلوگیری می کند، سودی متابولیکی از این کند شدن خاطر نشان نشده است. تغییراتی که این دو ماده در جمعیت های میکروبی و تخمیری شکمبه ایجاد می نمایند، براساس گیرنده بودن الکترون توسط این دو ماده صورت می گیرد. در نهایت گونه های میکروبی و میزبان به تغذیه طولانی مدت نیترات عادت پیدا می کنند. احتمالا عادت پذیری یک پروسه دو مرحله ای با افزایش ناگهانی در مقدار نیترات ردوکتاز (ده تا پانزده برابر حالت عادی) و یا کاهش در تعداد باکتری ها در شکمبه و افزایش باکتری های مصرف کننده نیترات می باشد. این روند کاهش در تعداد باکتری ها البته با گزینش تدریجی گروه هایی ازباکتری ها که میتوانند نیترات ونیترت را احیا کند، دنبال می شود. در مدت عادت پذیری تعداد باکتری های مقاوم به نیترات در شکمبه از ۲ درصد تا نزدیک به ۲۰ درصد افزوده میشود. نیترات ردوکتاز احتمالا از طریق پلاسمید منتقل می شود. در شرایط حضور نیترات، این آنزیم به گروه های ویژه باکتریایی مزیتی برای مصرف عوامل احیایی می دهد (با صرف انرژی کمتر). همچنین، به خاطر اثر ممانعت کنندگی نیتریت بر کلوستریدیاها و دیگر باکتری های بی هوازی، تنوع جمعیت باکتری های عادت ناپذیر شکمبه به بیش از ۶۰ درصد کاهش می یابند. پروتوزوآها (یکی از جمعیت های مفید شکمبه ای) احتمالا در عمل احیای نیترات وارد نمی شوند.

● **اگزالات ها؛** نمک کلسیمی، سدیمی و پتاسیمی اسید های اگزالیک محسوب شده که می تواند یکی از محدود کننده های مهم در شکمبه محسوب گردند. اگزالات ها بر جمعیت گونه های میکروبی و محصولات پایانی آنها با محدود کردن تبادلات کاتیونی اثر بسزایی خواهند داشت. این دسته از مواد می توانند حتی تا ۳۰ درصد وزن یک گیاه را شامل شوند. مهمترین منابعی که حاوی اگزالات بالایی

هستند شامل کاه برنج، برگ های آکاسیا، علوفه چغندر بخصوص نوع ولگاریس و سایر غده ها، علف قلیاب (*Halogeton glomeratus*) و انواع گراس ها (*Cenchrus ciliaris*، *Panicum* spp، *Pennisetum clandestinum*، *Setaria sphacelata*) می باشد. اسیدهای اگزالیک می توانند توسط باکتری های اگزالوباکتر فورمیجنز (*Oxalobacter formigenes*) و سینرجیستس جونسی (*Synergistes jonesii*) همراه با صرف انرژی (میزان مصرف انرژی برای اکسید کردن اسیدهای اگزالیک کم می باشد) مصرف و به اسید فورمیک و دی اکسیدکربن تبدیل شوند. در صورت عادت پذیری دام و میکروارگانیسم های شکمبه می توان با اندک جمعیت میکروبی حداکثر مصرف اسید اگزالیک را داشت. لذا برای کنترل این محدود کننده لازم است که جیره را تغییر داده و یا عادت پذیری جمعیت میکروبی شکمبه را آغاز نمود. در مطالعات اثبات شده است که بهترین راه کار درباره کنترل اسید اگزالیک، عادت پذیری دام و میکروارگانیسم ها به آن می باشد. اما در صورت مسمومیت مهمترین اثر اگزالات ها در علفخواران ایجاد هیپوکلسیمی (به دلیل اتصال با کلسیم و حذف قدرت جذب آن) خواهد بود. افزایش اگزالات در حد معقول می تواند تولید متان را افزایش داده و جمعیت باکتری های متان ساز را بهبود بخشد. اگزالات قادر به افزایش استات در مقابل پروپیونات می شود. همچنین، مصرف اگزالات در ابتدا با کاهش جزئی مصرف و سپس با عادت پذیری بر میزان مصرف بی تاثیر خواهد بود. اثر اگزالات بر جمعیت های میکروبی به مقدار مصرف، مدت زمان مصرف و اثر میکروب های مصرف کننده اگزالیک بر سایر میکروارگانیسم ها می باشد. در صورت عادت پذیری، اسیدهای اگزالیک می تواند در تخمیر برای تولید انرژی بکار گرفته شود.

- **آلکالوئیدها؛** ترکیبات نیتروژن دار هتروسیکلیک موجود در علوفه هستند که می توانند تغییرات اکولوژیکی گسترده ای را در شکمبه براساس منع هضم پذیری مواد مغذی و توقف انتقال الکترون در غشای میکروبی ایجاد کنند. البته همه آلکالوئیدها سمی نبوده و دسته ای از آنها مانند رنگدانه های موجود در چغندر قند و هویج که آلکالوئید رنگ و طعم دهنده محسوب می شوند، سمی نیستند. اما آلکالوئیدهای سمی متنوع بوده و شایع ترین آنها در سیب زمینی (سولانانین)، گراس های زراعی مانند علف قناری (ایندول آلکیلامین) و فسکیو (پرلولاین و پرلولایدین)، در غلات کپک زده (ارگوت ها)، در گونه های از کاسنی ها (پیرولایزیدین)، شلغم و گونه های مشابه (پروآنتوسیانیدین) و گروه لگومینوزه (فنانتریدین) مشاهده می شود. میکروارگانیسم های شکمبه بعضی از آلکالوئیدها را به سختی متابولیسم نموده و گاهی قادر به تخریب آنها نمی باشند. در این موارد استفاده از گیاهان دارای مواد آلکالوئیدی در جیره باید خودداری نمود. در بین نشخوارکنندگان گوسفند و بز به بعضی از ترکیبات آلکالوئیدی بیشترین مقاومت را نشان می دهند. لازم به تذکر است که میزان سم مصرفی، مدت زمان

مصرف و نوع جیره می تواند بر جمعیت گونه های میکروبی و میزان فعالیت آنها موثر واقع شود. در بین میکروارگانیسم ها، پروتوزوئرهای کوچک اولین گروه حذفی در هنگام ورود آلکالوئیدها محسوب می شوند. اما با افزایش میزان مصرف سم کاهش گونه های پروتوزوئری بزرگ جثه، باکتری های بزرگ جثه و در نهایت توقف فعالیت باکتری های کوچک و گونه های قارچی اتفاق خواهد افتد. در بین گونه های باکتریایی، گونه های پپتوکوکوس (*Peptococcus* sp.) و بوتیرویبریو فیبری سولونس جهت کنترل این سمیت افزایش می یابند. همراه با این افزایش باکتری های متان ساز می توانند فعالیت خاص را آغاز و تولید متان را افزایش دهند. البته با ازدیاد سم میزان فعالیت باکتری های متان ساز کاهش می یابد. ورود آلکالوئیدها به شکمبه سبب کاهش هضم فیبر بخصوص لیگنین ها شده و فعالیت باکتری های پروتئولایتیک را نیز کاهش می دهد.

• **سیانیدها:** اسید هیدروسیانیک (HCN = Hydrocyanic Acid) یا اسید پروسیک (Prussic Acid) عموماً در برخی از گیاهان تحت شرایط تنش (مانند استرس رطوبت، یخبندان، زیادی ازت و رشد مجدد در اثر چرای بی رویه) و در اثر فعالیت های آنزیمی بر روی ترکیباتی موسوم به گلوکوزیدهای سیانوژنیک و بعبارتی دیورین (Dhurrin) شکل می گیرد. مهمترین ترکیبات سیانیدی شناخته شده لینامارین (Linamarin)، آمیگدالین (Amygdalin)، لوتاسترالین (Lotaustralin)، پروناسین (Prunasin) و نمک های سیانیدی مانند تیوسیانات ها (Thiocyanate) می باشد. ماندگاری نمک های سیانیدی در شکمبه بیشتر از مواد سیانیدی دیگر می باشد، لذا اثر تخریب کنندگی آنها می تواند بیشتر آشکار گردد. براساس فرضیه تنش می توان گفت که همه گیاهان (بیش از ۲۰۰۰ گونه) مستعد حضور سیانید های می باشند، اما گیاهانی مانند انواع سورگوم، سودان گراس ها، قیاق ها، کاساوا، آکاسیا، پنجه مرغی، اوکالیپتوس، شبدر سفید، لوبیا، کتان و سرخس ها بیشترین تراکم سیانیدها را خواهند داشت. کلیه نشخوارکنندگان از قبیل گوساله های نر، ماده و پرواری، گوسفندان و بُزها در معرض مسمومیت HCN قرار دارند. اما گوسفندان تا حدودی مقاوم تر از گوساله ها بنظر می رسند. در این بین بزها بیشترین حساسیت را در بین نشخوارکنندگان به اسید پروسیک دارند. از دلایل حساسیت نشخوارکنندگان به HCN وجود شرایط اسیدی ملایم ۶ تا ۷ در شکمبه آنان، آب فراوان در شکمبه و حضور آنزیم های فراوان میکروبی برای هیدرولیز گلیکوزیدهای سیانوژنیک می باشد. نوشیدن آب بعد از خوردن گیاهان حاوی سیانید ها مانند سورگوم موجب افزایش هیدرولیز گلیکوزیدها می شود. بنابراین باید به دام ها از دانه های غلات، علوفه گراس ها، علوفه های خشک یا یونجه برای افزایش اسیدیته تا محدوده ۴ تا ۶ جهت کُند شدن آزاد سازی سیانید خورانید.

علامت های مسمومیت سیانید در دام ها متنوع و از افزایش تنفس، نبض، بازدم شدید، سایش دندان و ادرار مکرر گرفته تا به گیجی، گرفتگی عضلات، رخوت، اغماء و مرگ می انجامد. اثر سیانیدها در فعالیت های تخمیری شکمبه و گونه های میکروبی همچنان در پرده ای از ابهام قرار دارد. اما امروزه بر محققین روشن است که دسته ای از باکتری ها با ورود سیانید بیشترین فعالیت را از خود نشان داده تا بتوانند مسمومیت ایجاد شده را کاهش دهند. این باکتری ها شامل باکتروئیدس آمیلوفیلوس، باکتروئیدس رومینوکولا، باکتروئیدس ساکسینوژنز، بوتیرویبریو فیبریوسولونس، گونه کلستریدیوم ها، گونه های کوپروکوکوس (*Coprococcus* sp.)، لاچنوسپیرا مولتی پاروس، مگاسفرا السدنی، ائوباکتریوم رومینانتیوم، گونه لاکتوباسیلوس ها، رومینوکوکوس آلبوس، رومینوکوکوس فلاوفاسینس، سلنوموناس رومینانتیوم، سلنوموناس لاکتی لایتیکا، گونه استافیلوکوک ها، سوکسینوویبریو دکسترینوسولونس و استرپتوکوکوس بوریس (*Streptococcus boris*) می باشد. همچنین میزان آمونیاک تولیدی در شکمبه کاهش یافته و جمعیت دسته ای از باکتری ها کاهش می یابند. البته درباره افزایش یا کاهش پروتئزوئرها همچنان ابهاماتی وجود دارد. اما می توان براساس کاهش باکتری ها، کاهش پروتوزوئرها را دارای صحت بیشتر دانست.

- **میموزا؛** یک آمینو اسید غیر معمول ([*N*-(3-hydroxy-4-oxopyridyl)]-a-aminopropioniac acid) است که به مقدار فراوان در نوع علوفه های لگومینوزه بخصوص علوفه چوبی لئوکانئا لئوکوسفالا (*Leucaena leucocephala*) وجود دارد. این علوفه چوبی به همراه سایر گیاهان لگومینوزه حاوی میموزین به شکل گسترده در نواحی گرمسیری یافت می شوند. این ترکیب به شدت برای تک معده ای ها و نشخوارکنندگانی که عادت نیافته اند، سمی و خطرناک می باشد. این ترکیب در شکمبه توسط میکروارگانیسم ها به اجزای سمی گواتر زا یعنی ۴،۳-DHP (۳ هیدروکسی ۴ پیریدین) و ۳،۲-DHP (۲ هیدروکسی ۳ پیریدین) تبدیل می شوند. هر دوم ماده تولید شده در شکمبه برای دام عوارض نامناسب و مرگ آوری را رقم خواهد زد. آزمایشات نشان داده است که بزهای نواحی هاوایی با مصرف میموزین به مقدار حداکثری آن در روز هیچ مسمومیتی را از خود نشان نخواهند داد. در حالیکه سایر دام ها با مصرف اندک میموزین دچار مسمومیت می شدند. با مایه کوبی میکروارگانیسم جونسی از شکمبه بزهای هاوایی به سایر دام ها مسمومیت ناشی از مصرف میموزین متوقف گردید. این میکروارگانیسم و سویه های آن از دسته گرم منفی ها، میله ای شکل و غیر متحرک بوده و کاملا بی هوازی زیست می کنند. این گروه از باکتری ها می توانند آرژنین و هیستیدین را در حضور DHP تجزیه و قادر به هضم کربوهیدرات نمی باشند. اثرات میموزین بر فعالیت های تخمیری میکروب ها همچنان در هاله ای از ابهام باقی مانده است. اما با مصرف میموزین اگر چه تغییراتی در

ترشح بزاق دام ایجاد می شود، اما تغییرات در سطح اسیدیته شکمبه مشاهده نشد. با وجود شبهات و عدم اجماع در مقالات ارائه شده، میموزین سبب ازدیاد کل اسیدهای چرب فرار بخصوص اسید استیک و کاهش اسید پروپیونیک می شود. میموزین بر تولید اسید بوتیرات بی تاثیر بوده و بر تغییر جمعیت پروتوزوئرها کاملا بی اثر می باشد. میموزین علاوه بر موارد فوق بر افزایش غلظت آمونیاک شکمبه اثر مستقیم دارد.

نهایتا ترکیبات ضد تغذیه فراوانی براساس مناطق مختلف جغرافیایی در گیاهان دیده می شود. بطور مثال؛ گون در ایران می تواند قابلیت هضم مواد مغذی را با ایجاد ساختار آرابینوگالاکتون کاهش دهد. آرابینوگالاکتون ساختاری است که از چسبیدن باکتری های سلولایتیک به سلولز ممانعت بعمل می آورد. اما اشاره کردن به همه آنها از عهده کتاب پیش رو خارج بوده و تنها به مهمترین آنها اشاره شد.

۸-۳-۴-۲ عناصر معدنی و صنعتی ضد تغذیه ای

نشخوارکنندگان به دلیل تنوع در کمیت و کیفیت خوراک مصرفی احتمال مصرف مواد معدنی سنگین و صنعتی را دارند. جمعیت و فعالیت میکروارگانیسم ها به دلیل ارتباط مستقیم با این دسته از مواد زودتر از دام ها به شدت تحت تاثیر قرار می گیرند. از آنجا که میکروب ها قادر به سم زدایی این دسته از مواد نمی باشند، ازدیاد آنها سبب کاهش رشد و حذف تدریجی میکروارگانیسم ها می شود. این مواد می توانند از طریق شرب آب های آلوده که از کانال های صنعتی وارد مزارع کشاورزی شده اند و یا از مواد شوینده و ضدعفونی کننده ای که در بخش بهداشتی دامداری ها مورد استفاده قرار می گیرند، وارد خوراک دام می شوند. تاثیر این مواد بر روی میکروب ها براساس نوع ورود ماده مصرفی متغیر می باشد. اما در صورت ازدیاد مصرف، همه آنها سبب حذف گونه های میکروبی و اختلال در تخمیر می شوند.

مسمومیت عناصر سنگین صنعتی و مواد بهداشتی به میزان حلالیت آنها در مایع شکمبه و قدرت تشکیلات یونی آنها دارد. عناصر سنگین و مواد شوینده به دو نوع قابل تجزیه و غیرقابل تجزیه تقسیم می شوند. آلاینده های غیر قابل تجزیه نظیر ترکیبات و نمک های فلزات سنگین، هیدروکربن های هالوژنه (ناشی از فاضلاب بخش کشاورزی)، ترکیبات شیمیایی فنولی با زنجیره بلند، آفت کش ها مانند DDT هستند، که در مایع شکمبه تجمع می یابند. مهمترین فلزات سنگین موثر در مایع شکمبه شامل سرب، آلومینیوم، جیوه، مس، کادمیوم، مس، نیکل، سلنیوم، استرانشیوم و آرسنیک می باشد. در بین عناصر سنگین جیوه به دلیل استفاده رایج در ضدعفونی، سرب به جهت استفاده فراوان در صنعت (بخصوص در صنعت چاپ و کاغذ) و مس به دلیل فراوانی در خاک و گراس ها اهمیت فراوانی دارند. ایراد اصلی فلزات سنگین عدم تجزیه جهت سم زدایی است. این مواد می توانند رشد و گسترش

میکروب های بیماری زا را نیز افزایش دهند. فلزات سنگین با جایگزینی بجای املاح و مواد معدنی مورد نیاز ادامه فعالیت های تخمیری را متوقف می کنند. اگر چه تناقضات فراوانی بین آزمایشات ارائه شده در زمینه سم زدایی عناصر سنگین و مواد شوینده دیده می شود، اما این تضادها می تواند ناشی از تغییرات جیره، غلظت مواد سمی و ترکیبات مصرفی باشد.

در غلظت های پایین، دسته ای از باکتری ها با تغییر شکل ساختاری ملکول، سمیت عناصر فوق را کاهش می دهند. در این بین، پروتوزوئرهای مژک دار و بعضی از قارچ ها بخصوص مخمرها بعد از عادت پذیری جزء گروه های اصلی برای کاهش این سمیت در نظر گرفته می شوند. اما مسمومیت این مواد سبب کاهش کل اسیدهای چرب فرار بخصوص اسید استیک و کاهش گاز تولیدی متان از تخمیر می شود. البته آزمایشات نشان داده است که اسید پروپیونیک با مصرف عناصر سنگین افزایش جزئی خواهد داشت. بیشترین حساسیت به عناصر سنگین در باکتری های باکتروئیدس ساکسینوژنز، باکتروئیدس آمیلوفیلوس، رومینوکوکوس آلبوس و ائوباکتریوم رومینانتیوم می باشد. باکتری های مگاسفرا السدنی، سلنوموناس رومینانتیوم و بوتیرویبریو فیبروسولونس مقاومت بیشتری از خود نشان داده اند. این در حالی است که باکتری استرپتوکوکوس بیشترین مقاومت و پایداری را در مقابل همه عناصر سنگین از خود بروز داده و توسعه گسترده ای می یابند. در کنار این باکتری ها گروه پرتوزوئرهای تاژک دار بخصوص انتودینیوم کائوداتوم بیشترین مقاومت را در برابر عناصر سنگین داشته و حتی تا جمعیتی معادل ۱۸ تا ۳۲ درصد توده زنده را در بر می گیرند. در این میان دو گونه داسی تریشیا رومینانتیوم و افریو اسکولکس تری کوروناتوس هیچ حساسیتی نسبت به حضور عناصر سنگین از خود نشان نمی دهند و گسترش عادی خود را خواهند داشت.

با همه موارد اشاره شده، اولین اثر واضح و آشکار استفاده از ترکیبات فوق توقف فعالیت های هضمی پروتئین در شکمبه و سپس کاهش فعالیت های هضمی فیبر می باشد. فعالیت های آنزیمی همواره به کوفاکتورهایی نیازمند است که ساختار آنها حاوی عناصر فلزی مانند منیزیوم می باشد. گاهی دیده شده است که در غلظت های بسیار کم، عناصر سنگین می توانند بعنوان ساختار اتمی کوفاکتور مورد استفاده قرار گیرند (مانند کادمیوم، مس و غیره که در فسفوریلاسیون و ترانس فسفوریلاسیون انرژی کاربرد دارند). اما در غلظت های بالا روند مزبور معکوس و متوقف کننده فعالیت های آنزیمی می گردد. بطور مثال؛ بیش بود کادمیوم، کرومیوم، جیوه و مس سبب توقف فعالیت اوره آز باکتریایی (جدول ۵-۸)، گلوتامات دهیدروژناز و گاماگلوتامات ترانسفراز می شود. همچنین، افزایش فعالیت های ترانس آمیناز در حضور کادمیوم می تواند ناشی از خرد شدن غشای سلول باکتری و آزاد شدن اسیدهای آمینه آنها باشد. درباره اثر مواد شوینده بر فعالیت های تخمیری و جمعیت های میکروبی

تحقیقات خاصی ارائه نشده و آزمایشات اندک انجام شده دارای صحت اعتباری کمی می باشند. اما مشخص گردیده است که مواد شوینده و ضدعفونی غیر آنزیمی بهداشتی که حاوی ترکیبات کلراید و سولفات هستند، با تغییر در مسیرهای بیوشیمیایی تخمیر، تغییر ناگهانی فشار اسمزی، کاهش تعادل آنیون-کاتیون های مایع شکمبه و کاهش اتصال میکروب ها با مواد مغذی (به دلیل شستشوی چربی غشاء و کاهش نقاط اتصال در باکتری ها) می توانند جمعیت میکروب ها را دستخوش تغییر قرار دهند. اگر چه در صورت بروز بعضی از تک ناهنجاری ها مانند نفخ، مواد شوینده (بخصوص نوع عادی حاوی نمک سدیم) می تواند فشار اسمزی و قدرت چسبندگی بالای مواد کف زا را کاهش داده و جمعیت میکروبی را برای ادامه فعالیت بهبود ببخشد. اما همین شوینده های بکار رفته در بخش بهداشت دامداری می توانند با ورود بیش از اندازه به شکمبه جمعیت و فعالیت میکروبی را به حالت ناپایدار رسانده و شرایط را نامساعد کند. مواد شوینده آنزیمی هم براساس نوع آنزیم موجود در مواد شوینده می تواند بر تنوع گونه های میکروبی و فعالیت های تخمیری شکمبه موثر باشند.

جدول ۵-۸ اثر عناصر سنگین بر فعالیت اوره آز باکتریایی.

عناصر مصرفی	تراکم (mM)	درصد محدودیت	عناصر مصرفی	تراکم (mM)	درصد محدودیت
جیوه	۰/۰۲	۱۲	منگنز	۵	۹۳
	۰/۲۰	۱۰۰		۱۰	۹۷
نیکل	۰/۰۲	۸۴	باریوم	۲	۱۸
	۰/۲۰	۹۷		۵	۳۵
کادمیوم	۰/۰۲	۲۰		۱۰	۵۵
	۰/۲۰	۱۰۰	استرانشیوم	۲	۰
کبالت	۰/۰۲	۹۰		۵	۰
	۰/۲۰	۹۷		۱۰	۰

سابرامانیام ۱۹۷۷.

۳-۴-۳-۸ سموم میکروبی

نشخوارکنندگان از خوراک هایی استفاده می کنند که دائما در معرض آلودگی میکروبی بخصوص قارچ ها قرار دارند. آلودگی های میکروبی مانند سموم قارچی و باکتری ها بیشتر بر روی مواد پر تراکم جو، گندم، ذرت و سایر اقلام مشاهده می شوند. البته این آلودگی ها بر روی علوفه، مواد سیلویی و حتی محصولات پسمانده از فرآوری محصولات کشاورزی دیده خواهد شد. قارچ ها بیشترین و موثرترین آلودگی را در بین سایر میکروارگانیسم ها بر روی محصولات کشاورزی و خوراک دام ایجاد

نموده و تا ۲۵ درصد محصولات کشاورزی را با تولید مایکوتوکسین آلوده می نمایند. در بین گونه های قارچی، آسپرژیلوس (*Aspergillus*)، فوزاریوم (*Fusarium*)، پنی سیلیوم (*Penicillium*) و آلترناریا (*Alternaria*) بیشترین تخریب و آلودگی را ایجاد می نمایند. اگر چه بیش از ۴۰۰ نوع مایکوتکسین در جهان شناخته شده است (جدول ۶-۸)، اما تعداد کمی از آنها در سیستم تولید نشخوارکنندگان مهم به نظر می رسند. حیوانات نشخوارکننده در میان حیوانات کمتر به مسمومیت قارچی حساس می باشند. بطوریکه میکروارگانیسم های شکمبه به طور موثر سموم قارچی را تجزیه می نمایند.

جدول ۶-۸ مهمترین مایکوتوکسین های موجود در علوفه و مواد دانه ای.

گونه قارچی	مایکوتوکسین
Aspergillus flavus; A. parasiticus	Aflatoxins
A. flavus	Cyclopiazonic acid
P. citrinum; P. expansum	Citrinin
P. citreo-viride	Citreoviridin
Fusarium culmorum; F. graminearum	Deoxynivalenol
F. sporotrichioides; F. graminearum; F. poae	Diacetoxyscirpenol
Neotyphodium coenophialum	Ergopeptine alkaloids
Claviceps purpurea	Ergot alkaloids
F. moniliforme	Fumonisins; moniliformin; fusaric acid
N. lolii	Lolitrem alkaloids
A. ochraceus; Penicillium viridicatum; P. cyclopium	Ochratoxin A
P. expansum	Patulin
Phomopsis leptostromiformis	Phomopsins
Pithomyces chartarum	Sporidesmin A
Alternaria alternata	Tenuazonic acid; altenuene; alternariol methyl ether
F. sporotrichioides; F. poae	T-2 toxin
F. culmorum; F. graminearum; F. sporotrichioides	Zearalenone

در بین قارچ های فوق فوزاریوم، پنیسیلیوم و آسپرژیلوس در علوفه به همراه جیبرلا (*Gibberella*) بیشتر مشاهده می شوند.

ظرفیت مسمومیت زدایی میکروب های شکمبه، با تغییر جیره و امراض متابولیکی مانند اسیدوز و نفخ متغیر و قابل اشباع است. آزمایشات ارائه شده در این زمینه تایید کننده فرضیه فوق بوده و اکثر باکتری ها به همراه گونه های محدودی از پروتوزئرها قادر به هضم بعضی از مایکوتوکسین ها هستند. بطور مثال؛ سم اوکراتوکسین آ (*Ochratoxin A*) پس از ورود به شکمبه کاملا توسط باکتری ها سم زدایی می شود. اما میزان سم زدایی مایکوتوکسین ها (بین صفر تا ۹۰ درصد) به نوع خوراک مصرفی،

کیفیت و کمیت سم مصرفی و مدت زمان حضور سم در جیره وابسته می باشد. بدین معنی که اگر چه اوکراتوکسین آ توسط باکتری ها تجزیه می شود، اما اوکراتوکسین سی توسط باکتری ها سم زدایی نشده و یا با افزایش مصرف اوکراتوکسین آ تحولات نامناسب خاصی در شکمبه بوجود می آید. همچنین، سم زدایی آفلاتوکسین توسط میکروب های شکمبه بین ۳۰ تا ۵۰ درصد براساس نوع و مقدار مصرف آفلاتوکسین همراه با جیره مصرفی تغییر می نماید. این دامنه نشان از اثر سم و جیره در سم زدایی می باشد.

برای سم زدایی مایکوتوکسین ها اسیدیته شکمبه از اهمیت خاصی برخوردار بوده (pH = ۶ – ۷ مطلوب) و افزایش اسیدیته میزان سم زدایی را کاهش می دهد. آسیب شناسی نشان داده است که میکروارگانیسم های شکمبه با تبدیل نمودن سموم قارچی نظیر آفلاتوکسین، اکراتوکسین و تریکوتیسنس ها از جمله دی اکسی نیوالنون، به متابولیت های با سمیت کم تر نظیر آفلاتوکسیکول، آلفا- اکراتوکسین و دی- اپوکسی- تریکوتیسنس، اولین خط دفاعی حیوانات نشخوارکننده را تشکیل می دهند. به دنبال آن، پایداری بسیاری از سموم قارچی دیگر مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که تمام سموم قارچی به وسیله میکروارگانیسم های شکمبه و از طریق آنزیمی شکسته نمی شوند. برای مثال؛ فومونیسین ها شکمبه را بدون آن که تحت تأثیر قرار بگیرند ترک می نماید و زرالنون به ترکیب قوی تری به نام آلفا زرالنول تبدیل می شود. به طور کلی فرض بر این است که در داخل شکمبه، جمعیت پروتوزوآیی، بیش ترین توانایی را برای سم زدایی سموم قارچی خورده شده دارد (مثلا در سم زدایی T-2 toxin پروتوزوئرها نقش بیشتری در مقابل باکتری ها از خود نشان داده اند)، ولی این امر در بین دسته های مختلف سموم قارچی متغیر بوده و ارتباط باکتری ها و سایر میکروارگانیسم های شکمبه می تواند کم تر از حد تخمین زده شود. در مجموع تحقیقات ارائه شده در زمینه ورود مایکوتوکسین ها به شکمبه نشان می دهد که ورود بیش از اندازه سم سبب افزایش نرخ عبور و کاهش هضم مواد مغذی مانند نشاسته می شود. از طرف دیگر می تواند مصرف ماده خشک را همراه با فعالیت های باکتری های هاضم فیبر کاهش داده و میزان گاز تولیدی، کل اسیدهای چرب فرار و غلظت آمونیاک شکمبه را تغییر دهد.

از دیگر عوامل موثر بر جمعیت میکروارگانیسم های شکمبه گستردگی سم مصرفی بر میکروارگانیسم ها می باشد. دسته ای از سموم فقط بر یک یا دو گونه میکروبی تاثیر داشته و دسته دیگر بر گونه های مختلف موثر می باشند. مثلا با ورود سم حاصل از فوزاریوم حذف دو گونه باکتریایی به نام متانوبروی باکتر رومینانتیوم (مسئول تولید متان) و رومینوکوکوس آلبوس (تخمیر کننده سلولز) حتمی می شود. حضور فوزاریک اسید (بالای ۶۰ ppb) حاصل از فوزاریوم می تواند رشد باکتری ها را

مختل و متوقف نماید. در حالیکه حضور سم پاتولین (Patulin) که یک لاکتون حلقوی (یک استر حلقوی که ترکیبی از یک گروه الکل و یک گروه اسید کربوکسیلیک می باشد) است، دارای فعالیت ضد میکروبی وسیعی در برابر باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و پروتوزوآها می باشد. مطالعات دیگر نشان داده است که اثرات ضد میکروبی پاتولین علاوه بر کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و استات، بر سنتز پروتئین در مایع شکمبه نیز اثر منفی داشته است. اما علاوه بر گستردگی فعالیت سموم میکروبی، سرعت تخمیر و هضم مایکوتوکسین ها در شکمبه از اهمیت بالایی برخوردار است (جدول ۷–۸). هر چقدر سرعت تجزیه هضم سموم مایکوتوکسینی بالاتر باشد، میزان تخریب جمعیت های میکروبی توسط سم کمتر خواهد بود. برای سرعت بیشتر سم زدایی غالب بودن بعضی از گونه ها از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. بطور مثال؛ بوتیرویبریو فیبروسولونس می تواند سرعت سم زدایی T-2 toxin را افزایش دهد. در نهایت مایکوتوکسین ها از طریق تغییر زمان تاخیر (Lag time) جهت رشد میکروارگانیسم ها و یا کاهش هضم مواد مغذی و جذب آنها از غشای میکروبی بر روند تخمیر و جمعیت گونه های میکروبی شکمبه موثر خواهند بود.

جدول ۷–۸ نرخ تجزیه پذیری بعضی از مایکوتوکسین ها در شکمبه.

ردیف	تراکم سم (μg/ml)		نرخ تجزیه پذیری (μg/L) در ساعت
۱	آفلاتوکسین B_1	(۱/۰)	۳۰
		(۱۰/۰)	۱۷
۲	آفلاتوکسین G_1	(۱/۰)	۳۰
		(۱۰/۰)	۲۳
۳	T-2 toxin	(۱۰/۰)	۲۲۲۰
۴	HT-2 toxin	(۱۰/۰)	۱۸۳۳
۵	دی اکسی نیوالنول	(۱۰/۰)	۲۲۳۰
۶	دی استوزیسکرپنول	(۱۰/۰)	۲۰۶۶

علاوه بر سموم قارچی، گروهی از باکتری ها مواد از خود ترشح می کنند که می توانند بر جمعیت گونه های دیگر میکروبی اثر منفی داشته باشند. این مواد در مجموع باکتریوسین نامگذاری می شوند. همانطور که در فصول قبلی اشاره شده است، این مواد از هر دو باکتری های گرم مثبت و گرم منفی ترشح شده و به صورت یک ماده پروتئینی (زنجیره پپتیدی) به جایگاه های روی غشاء باکتری متصل و از فعالیت های حیاتی مانند تغذیه ممانعت بعمل می آورند. مهمترین مثال در این زمینه *Butyrivibriocin AR10* می باشد که بوتیرویبریوفیبروسولونس برای مقابله با سایر باکتری ها در مواد

سیلویی به وفور ترشح می کند. بعضی از باکتری های هوازی که بر روی مواد غذایی فعالیت می کنند، باکتریوسین یا سمومی ترشح می نمایند که می توانند بر فعالیت سایر میکروب ها دخالت نمایند.

۸-۳-۴-۴ استراتژی حذف سموم مصرفی

برای سم زدایی مواد سمی مصرف شده یکدسته اصول اکولوژیکی وجود دارد که براساس آنها می توان محیط شکمبه را برای فعالیت های میکروبی مطلوب نمود. این اصول به پنج بخش (۱)- بهره گیری از عامل های سمی بعنوان منابع انرژی یا گیرنده های الکترون در متابولیسم و تخمیر میکروبی (مانند نیترات ها)، (۲)- استفاده از فرآوری های فیزیکی (جداسازی، شستن، تابش و حرارت) و فرآوری های شیمیایی (مانند سیلوسازی، پختن، خیساندن، نمک اندود و تخریب توسط مواد قلیایی یا اسیدی)، (۳)- روش های بیولوژیک که با غیر فعال کردن سموم از طریق مصرف مواد جاذب سم و یا آنزیم های هاضم آنها امکان پذیر است (مانند یونفرها)، (۴) – اصلاح نژاد گونه های گیاهی بیماری زا مانند تغییر منداب به کلزا جهت کاهش سیانیدها و اسیدهای اروسیک و (۵)- ایجاد گونه جدید میکروبی (بکارگیری مخمرها) و یا تحریک گونه هایی که قدرت حذف سموم را دارند (اووباکتریوم ها)، تقسیم می شود. برای افزایش کارآیی سم زدایی بهتر است که از هر سه روش فوق بطور همزمان استفاده گردد. در بین روش های فوق روش دوم، سوم و چهارم پیشگیرانه و روش اول و پنجم رفع مسمومیت تعبیر می شوند.

۸-۴ دستکاری شکمبه براساس عوامل حیوانی

علاوه بر موارد اشاره شده، عوامل مهم دیگری هستند که بر جمعیت و تغییر گونه های میکروبی شکمبه دخالت دارند. یکی از آنها نوع دام است که بر گستردگی میکروارگانیسم ها اثر بسزایی خواهد داشت. این اثر از طریق شرایط فیزیولوژیکی دام، ناهنجاری های ایجاد شده و عادات غذایی که خود بر گرفته از فیزیولوژیکی دام می باشد، تاثیر خواهد داشت. شرایط فیزیولوژیک دام از طریق تغییر در جایگاه تخمیر (بخش پیشین و پسین دستگاه گوارش)، تعداد کیسه های تخمیر (از ۲ تا ۴ کیسه در حیوانات مختلف علفخوار)، ظرفیت کیسه های تخمیر (عامل مهمی در تغییر نرخ عبور مواد غذایی و زمان ماندگاری آنها دارد) و معیارهایی مانند آبستنی که سبب کاهش فضای تخمیر می شود، بر جمعیت گونه های میکروبی و فعالیت های تخمیری آنها موثر خواهد بود. تغییر در جایگاه تخمیر می تواند به شدت منجر به اختصاصی شدن میکروارگانیسم در یک موجود علفخوار گردد. اما، تعداد کیسه های تخمیر و ظرفیت هر یک از آنها بر جمعیت گونه های میکروبی بیشتر از اختصاصی شدن میکروب ها موثر تر خواهد بود.

۱-۴-۸ ناهنجاری های متابولیکی

ناهنجاری های متابولیکی ایجاد شده به دلیل نوع جیره نامتوازن مصرف شده می تواند شرایط نامطلوبی را برای فعالیت های میکروبی رقم بزنند. از بین ناهنجاری های موجود نفخ و اسیدوز از اهمیت ویژه برخوردار می باشد.

● **نفخ؛** با مصرف مقادیر زیادی از غلات و مواد علوفه ای حاوی کربوهیدرات سریع تخمیر و مواد کف زا مانند ساپونین موجود در لگوم ها بوجود می آید. درباره اثر نفخ بر گونه و جمعیت های میکروبی دو فرضیه اصلی وجود دارد که هریک به نوبه خود قسمتی از اثر نفخ بر میکروارگانیسم ها را به تصویر می کشند. فرضیه اول مربوط به باکتری های گرم مثبت است که بروز نفخ بخصوص نوع کفی را افزایش داده و با ایجاد نفخ گسترش می یابند. این باکتری ها مانند استرپتوکوکوس بوویس و دسته لاکتوباسیلوس ها که به اسیدیته بالا مقاوم بوده و در حضور کربوهیدرات سریع الهضم ازدیاد جمعیت می یابند، شکمبه را به سمت یک نفخ شدید سوق می دهند (البته دو باکتری مذکور نفخ زا نبوده و در صورت بروز نفخ آن را توسعه می دهند). این باکتری ها مواد قندی را تخمیر و اسیدیته را به شدت افزایش می دهند. با افزایش اسیدیته نرخ عبور کاهش و فعالیت فیزیکی شکمبه جهت واکنش آروغ متوقف می گردد. همچنین، به دلیل فعالیت گونه های میکروبی اسید ساز و فقدان گونه های تخمیر کننده اسید، ویسکوزیته شکمبه با حضور موکوپلی ساکاریدهای میکروبی وماکرومولکول های ناشناخته در اثر تجزیه سایر میکروب ها افزایش یافته و لعاب ایجاد شده نفخ کفی را بوجود می آورد. لعاب حاصل از گونه های میکروبی اسید ساز بخصوص در گونه های استروپتوکوکوس پایداری نفخ را افزایش می دهد. فرضیه دوم مربوط به اثر نفخ بر جمعیت میکروبی می باشد. در صورت بروز نفخ جمعیت باکتری های آمیلولایتیک همانند باکتری های هاضم فیبر بخصوص گروه سلولایتیک ابتدا افزایش و سپس رو به کاهش می روند. در این بین باکتری های متان ساز هم کاهش یافته و تنها در جمعیت پروتوزوئرها تغییر چندانی مشاهده نشده است. پروتوزوئرها می توانند حتی میزان نفخ را با بلعیدن گرانوله های نشاسته کاهش دهند. فرضیه دوم می تواند بیشتر مبین نفخ گازی ناشی از انسداد مرئیک باشد. اگر چه روند بررسی در دو فرضیه فوق متفاوت می باشد، اما در نگاه کلی نفخ می تواند جمعیت باکتریایی بجز پروتوزوئرها را دستخوش تغییر اساسی قرار دهد.

● **اسیدوز؛** در نشخوارکنندگان با مصرف مواد کربوهیدرات غیر ساختاری و سریع الهضم بوجود می آید. در سبب شناسی اسیدوز می توان گفت که اسید در شکمبه ناشی از فعالیت باکتری های آمیلولایتیک بخصوص گونه های سازنده اسید لاکتیک و پروپیونیک بوجود می آید. هنگامی مقادیر

زیادی از واحدهای قندی در اختیار باشد، باکتری هایی که بطور طبیعی جمعیت های رایج شکمبه نیستند، رشد و تکثیر سریع می نمایند. بطور مثال استرپتوکوکوس بوویس که باکتری با بازده پایین می باشد، در وفور قند تکثیر یافته و اسیدوز ناشی از اسیدلاکتیک را گسترش می دهند. و یا لاکتوباسیلوس ها با افزایش قند توسعه تصاعدی یافته و اسیدوز را رقم می زنند. همچنین باکتری های فرصت طلب مانند کلی فرم ها و آنهایی که جدا کننده عامل کربوکسیل از اسیدهای آمینه هستند، در وفور قند اسیدهای آمینه را به آندوتوکسین ها و یا آمیدها (مانند هیستامین و تیرآمین) تبدیل و اسیدوز را تشدید می کنند. بروز اسیدوز می تواند فعالیت باکتری های هاضم فیبر، باکتری های متان ساز، پروتوزئرها، تعداد زیادی از باکتری های آمیلولایتیک و قارچ ها را به ترتیب کاهش و حتی حذف نماید. اگر چه محققین راهکاری پیشگیرانه غذایی مناسبی برای کنترل اسیدوز ارائه کرده اند، اما دستکاری از طریق تغییر گونه میکروبی روش مناسبی است که نمونه آن به شرح ذیل می باشد:

۱- برای کاهش باکتری های فرصت طلب می توان از باکتریوفاژها و آنتی بیوتیک های خاص استفاده نمود.

۲- جمعیت پروتوزوئرها را به دلیل بلع نشاسته افزایش تا تولید اسید به تاخیر بیافتد. اگر چه در این زمینه شبهاتی دیده می شود.

۳- مایه کوبی باکتری های مصرف کننده اسید مانند مگاسفرا السدنی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس راهکار مناسبی است.

۴- تحریک رشد باکتری های مصرف کننده لاکتات مانند استرپتوکوکوس رومینانتیوم توسط برخی از اسیدهای کربوکسیلیک مانند فومارات و مالات می باشد.

۸-۴-۲ عادات غذایی

از معیارهای مهم در کنترل جمعیت میکروارگانیسم ها و توسعه گونه های اختصاصی، کمیت و کیفیت خوراک مصرفی براساس عادات غذایی می باشد. عادات غذایی تابع خصوصیات دستگاه گوارش و اندازه بدن علفخوار بوده و بین این سه معیار رابطه های خطی دو طرفه مشاهده می گردد. بدین صورت که حیواناتی که حجیم و خشبی خوارتر هستند، دارای شرایط دهانی و کیسه تخمیری توسعه یافته تری می باشند. در نهایت همانگونه که در فصل اول اشاره شده است، گیاهخواران براساس نوع خوراک مصرفی به سه گروه اصلی سرشاخه خواری (غزال ها، گوزن ها و زرافه)، خشبی خواری (گاوان، شتران و بوفالوها) و بوته خواری (گوسفند، انواع بز، گوزن های شمالی و ایمپالاها) تقسیم می شوند. آزمایشات بیانگر آن است که تغییر خوراک مصرفی از خشبی خواری به بوته خواری فعالیت

باکتری ها را از سلولایتیک به آمیلولایتیک تغییر می دهد. همچنین، سرشاخه خواری فعالیت باکتری های هضم کننده کوتین، واکس ها و اقلامی که بعنوان پوشش بر روی برگ ها قرار دارند را افزایش خواهد داد. بطور مثال؛ تنوع گونه میکروبی بین کاریبو (از گلسنگ قطبی مصرف می نماید) و زرافه (از برگ جوان آکاسیا سود می برد) زیاد است.

۸-۵ دستکاری های ژنتیکی

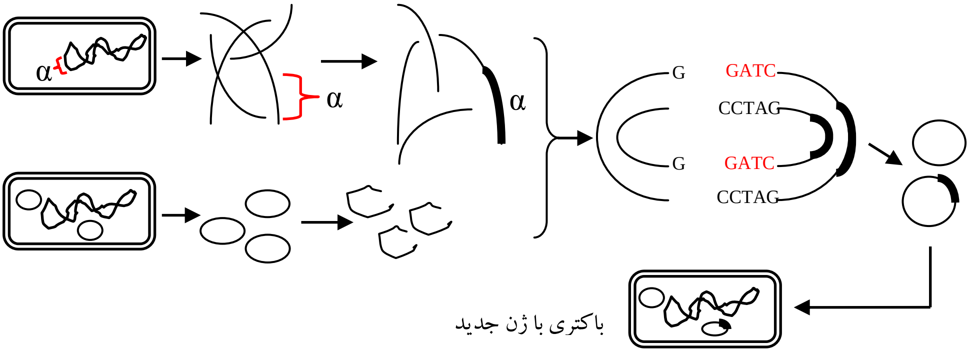
دستکاری میکروارگانیسم های شکمبه از طریق تغییرات ژنتیکی در تک یاخته یکی از علاقه هایی است که محققین تغذیه و ژنتیک تواما نزدیک به ۵۰ سال در مسیر آن فعالیت می کنند. اطلاعات موجود بیانگر آنست که این شیوه یکی از راه های قابل اطمینان در تجزیه و تخمیر مواد غذایی و کنترل مسیرهای مربوط به آن می باشد. امروزه اطلاعات کامل و جامعی برای کلونی سازی میکروب هایی که دستکاری ژنتیکی در آنها اتفاق افتاده باشد، کمتر دیده می شود. شاید علت اصلی این عدم جامعیت تفاوت های فراوان در گونه های میکروبی تحت آزمایش و امکانات آزمایشگاهی بوده است. با وجود تفاوت های ارائه شده در اندک مقالات مشاهده شده اصول کار برای کلونی سازی و تغییرات ژنتیکی میکروب ها یکسان و براساس تعدادی گونه خاص میکروبی در نظر گرفته می شود.

۸-۵-۱ اصول دستکاری ژنتیکی

دستکاری ژنتیکی به معنای تشکیل چیدمان جدید از مواد ژنتیکی (مانند اسیدهای نوکلئیک) که قابل توارث بوده و پس از قرارگیری در اجزای سلول میکروبی (مانند پلاسمید یا دیگر حامل های ژنتیکی) قابلیت رونویسی و اجرا داشته باشد. از ویژگی های اصلی این دستکاری این است که باید در حالت طبیعی اتفاق نیافتد. اما همان قابلیت های طبیعی ژنتیکی را از خود بروز دهد. به این ترتیب این تکنولوژی اجازه می دهد که یک فعالیت میکروبی که اهمیت فراوانی دارد را به میکروب دیگر انتقال داده و قابلیت میکروب جدید را دو چندان نمود. اصول کار دستکاری ژنتیکی در شکل ۶-۸ مشخص شده است. در این دستکاری ابتدا ماده ژنتیکی مانند DNA را از میکروب خالص سازی نموده و سپس توسط اندونوکلئازها که جایگاه های خاصی از ماده ژنتیکی را برش می زنند، بخشی از آن را برش و جدا می کنند. بطور مثال؛ اندونوکلئاز Sau 3A توالی چهار نوکلوتیدی -'5' GATC 3- را در زنجیره دو رشته ای DNA تشخیص می دهد و چهار باز متضاد را در زنجیره مقابل برش می زند.

سپس تکه برش خورده به پلاسمید (یک زنجیره دو رشته ای از DNA که بصورت تکرار شونده در سیتوپلاسم میکروب ها شکل می گیرد) که توسط اندونوکلئاز دیگری مانند BamHI (اندونوکلئاز

مزبور قدرت تشخیص توالی شش نوکلوتیدی GGATCC را داشته و از ناحیه G برش می زند) برش خورده است، بوسیله گروهی از حامل ها تزریق و ملحق می شود.



شکل ٦-٨ اصول دستکاری ژنتیکی میکروب ها.

۲-۵-۸ خواص دستکاری ژنتیکی

دستکاری ژنتیکی بر سه فرضیه استوار گردیده است. فرضیه اول مربوط به مقاوم سازی بعضی از گونه های مطلوب میکروبی در شکمبه براساس ورود یکسری ژن های مقاوم می باشد. بطور مثال؛ ورود ژن مقاوم به آنتی بیوتیک تتراسیاکلین از ایشرشیاکلی به بوتیرویبریو فیبروسولونس در این ردیف قرار می گیرد (جدول ۸-۸). فرضیه دوم مربوط به ورود مواد ژنتیکی به سلول میکروبی برای افزایش تولیدات مطلوب در شکمبه می باشد.

جدول ۸-۸ مقاوم سازی باکتری های رایج شکمبه به آنتی بیوتیک ها.

	ژن	میکروارگانیسم	روش کار
۱	مقاوم به تتراسایکلین	*P. ruminicola*	اتصال به پلاسمید
۲	مقاوم به اریتروماسین	*P. ruminicola*	انتقال توسط حامل شاتل (Shuttle)
۳	مقاوم به تتراسایکلین	*P. ruminicola*	از طریق الکتریسته با پلاسمید
۴	مقاوم به تتراسایکلین و اریترومایسین	*B. fibrisolvens*	از طریق اکثر حامل ها
۵	مقاوم به تتراسایکلین و اریترومایسین	*S. bovis*	از طریق اکثر حامل ها
۶	مقاوم به تتراسایکلین و اریترومایسین	*P. ruminicola*	از طریق حامل شاتل
۷	مقاوم به اریترومایسین	*R. albus*	از طریق الکتریسته با پلاسمید
۸	مقاوم به کلیندامایسین و اریترومایسین	*P. ruminicola*	از طریق الکتریسیته با حامل شاتل
۹	مقاوم به آمپی سیلین	*B. fibrisolvens*	از طریق حامل شاتل
۱۰	مقاوم به کلرامفنیکل	*B. fibrisolvens*	از طریق حامل شاتل
۱۱	مقاوم به اریترومایسین	*S. bovis*	از طریق حامل شاتل

اگر چه در این زمینه محدودیت هایی متوجه محققین شده است، اما به دلیل اهمیت کار همچنان در حال توسعه می باشد. و فرضیه سوم ایجاد یک گونه جدید میکروبی برای حمایت و حفاظت از محیط زیست شکمبه در برابر سموم وارد شده از گیاه و سایر میکروارگانیسم ها می باشد. اما با وجود مزایای فوق در این دستکاری ها، دستکاری ژنتیکی میکروب های شکمبه می تواند معایبی در پی داشته باشد. این معایب براساس نوع و شیوه دستکاری متفاوت خواهد بود. بطور مثال؛ اگر دستکاری براساس مقاوم سازی میکروارگانیسم ها به مواد آنتی بیوتیکی باشد، احتمال دارد میکروب های مقاوم شده وارد محیط زیست گردیده و با ورود به مناطق بحرانی و خارج از حالت تعیین شده آلودگی های زیست محیطی با مقاومت بالا را از خود بروز دهند (مانند ورود به بدن انسان و ایجاد بیماری در حالیکه آنتی بیوتیک ها کمتر بر آن موثر می باشد). و یا اگر دستکاری براساس تولید یک محصول آنزیمی یا یک گونه خاص میکروبی باشد، احتمال جهش های نامناسب و مخرب در میکروب بالا رفته و حتی روند تخمیر مواد مغذی را با اختلال همراه کند. این اختلال مانند حذف یک گونه میکروبی مطلوب از شکمبه به دلیل تهاجم میکروب تازه وارد و یا انباشته شدن بیش از حد محصول تولیدی همراه با تولید آنزیم دیگری که خارج از برنامه بوده است، می تواند صدمات جبران ناپذیر اقتصادی و جانی را به همراه داشته باشد. از طرف دیگر میزان ماندگاری ژن مزبور در تکثیر میکروبی از مواردی است که فعالیت دستکاری های ژنتیکی را با مشکل مواجه کرده است. در صورت پذیرش موفق و انتقال آن به نسل بعد تعمیم میکروب جدید به همه گونه های دامی یکی دیگر از مشکلات دستکاری ژنتیکی محسوب می گردد.

۳-۵-۸ رایج ترین دستکاری های ژنتیکی

اولین گذارش موفقیت آمیز در زمینه انتقال مواد ژنتیکی مربوط به فعالیت آنزیم سلولاز از فیبروباکتر ساکسینوژنز به اشریشیاکلی می باشد. تعدادی از این انتقالات ژنتیکی که موفقیت آمیز و رایج تلقی می گردد در جدول ۹-۸ لیست شده است. این جدول بیان کننده خواصی است که شامل: (۱)- حامل ها و بیان کننده های آنها بطور غالب بر پایه باکتری اشریشیاکلی (شامل pUC وابسته به پلاسمیدها، فاژها و کاسمیدها) می باشد. بجز سه آزمایش که بر پایه باکتروئیدس انجام شده است. البته باکتری های مزبور در شکمبه رایج بوده و کدهای پیش نویسی و ترجمه گر آن مشابه اشریشیاکلی عمل می نماید. (۲)- ژن ها از باکتری های غالب شکمبه تهیه و خالص سازی شده اند. بجز بعضی از آزمایشات که از قارچ های بی هوازی وابسته به گروه یوکاریوت ها با مواد ژنتیکی mRNA که از cDNA تهیه شده اند، استفاده شده است. البته گزارشی مبنی بر استفاده از پروتوزوئرها همچنان ارائه نشده است. (۳)- آنزیم های استحصالی از دستکاری ژنتیکی تک پایه (تک آنزیمی) بوده و تنها در گروه آنزیمی گلوکوزیدازها یا پلی ساکاریدازها مجموعه ای از زایلانازها و اندوگلوکونازها با هم دیده می شود. این جمع گرایی در

آنزیم می تواند اهمیت هضم فیبر را در شکمبه به تصویر بکشد. اهمیت فیبر در تخمیر بی هوازی را می توان به دلیل ارزان بودن ماده غذایی، در دسترس بودن و فراوانی زیاد، ساختارهای متنوع و تاثیر بر هضم سایر مواد غذایی دانست که محققین را بر آن داشته است تا به شناسایی ژن های کنترل کننده آنزیم های هاضم آنها روی بیاورند. با این وجود دسته ای از تحقیقات به سمت شناسایی آنزیم های هاضم پروتئین هم هدایت شده است (مانند آنزیم گلوتامات سنتتاز موجود در جدول ۹-۸).

جدول ۹-۸ تعدادی ژن کلونی شده از رایج ترین میکروارگانیسم های شکمبه.

ژن ها	منبع	حامل	محل بروز
سلودکستریناز	*B. fibrisolvens*	Plasmid pUC19	*E. coli*
اندوگلوکاناز	*B. fibrisolvens*	Phage λgt11	*E. coli*
بتا-گلوکوزیداز	*B. fibrisolvens*	Shuttle vector pEB1	*E. coli*
زایلاناز	*B. fibrisolvens*	Plasmid pUC19	*E. coli*
زایلاناز	*B. fibrisolvens*	Shuttle vector pEB1	*E. coli*
آمیلاز	*B. fibrisolvens*	Shuttle vector pEB1	*E. coli*
زایلاناز	*B. fibrisolvens*	Plasmid pUC18	*E. coli*
گلوتامین سینتتاز	*B. fibrisolvens*	Shuttle vector pEB1	*E. coli*
اندوگلوکاناز	*B. ruminicola*	Phage λB14	*E. coli*
زایلاناز	*B. ruminicola*	Plasmid pUC18	*E. coli*
اندوگلوکاناز	*F. succinogenes*	Cosmid pHC79	*E. coli*
زایلاناز	*F. succinogenes*	Phage λgtWESλB	*E. coli*
بتا-گلوکاناز	*F. succinogenes*	Plasmid pJI10	*E. coli*
اندوگلوکاناز / زایلاناز	*N. patriciarum*	Phage λZAPII	*E. coli*
اندوگلوکاناز / سلوبیوهیدرولاز	*N. patriciarum*	Phage λZAPII	*E. coli*
زایلاناز	*N. patriciarum*	Phage λgtWESλB	*E. coli*
زایلاناز	*N. frontalis*	Phage λZAPII	*E. coli*
زایلاناز	*P. ruminicola*	Plasmid pUC18	*E. coli*
زایلاناز	*P. ruminicola*	Plasmid pVAL-1	*B. thetaiotaomicron*
اندوگلوکاناز	*P. ruminicola*	Phage pGF7	*E. coli*
اندوگلوکاناز	*P. ruminicola*	Phage λgtWES	*E. coli*
اندوگلوکاناز	*P. ruminicola*	Plasmid pUC18	*E. coli*
زایلاناز	*P. ruminicola*	Plasmid pVAL-1	*B. fragilis, B. uniformis*
سلودکستریناز	*R. flavefaciens*	Plasmid pMEB200	*E. coli*
سلولاز / زایلاناز	*R. flavefaciens*	Phage λDASH	*E. coli*

ادامه جدول ۹-۸.

ژن ها	منبع	حامل	محل بروز
سلولاز	*R. flavefaciens*	Plasmid pUC13	*E. coli*
زایلاناز	*R. flavefaciens*	Plasmid pUC13	*E. coli*
اندوگلوکاناز / سلودکستریناز	*R. flavefaciens*	Shuttle vector pEB1	*E. coli*
زایلاناز / گلوکاناز	*R. flavefaciens*	Phage λEMBL3	*E. coli*
اندوگلوکاناز	*R. albus*	Plasmid pUC118, 119	*E. coli*
اندوگلوکوناز / زایلاناز	*R. albus*	Plasmid SY3 pBR322	*E. coli*
آمیلاز	*S. bovis*	Plasmid pUC18	*E. coli*

اگر چه انتقال ژنتیکی می تواند دستکاری های زیستی شکمبه را رقم بزنند، اما سئوال اساسی در این است که آیا همه میکروب ها می توانند پذیرای چنین دستکاری باشند؟ بطور خوش بینانه هم نمی توان گفت که همه باکتری ها پذیرای چنین عملی باشند. بطور مثال؛ باکتری های آمیلولایتیک که صرفا تخمیر کننده قند هستند، از پذیرش ژن های حاوی فعالیت های هاضم فیبر مانند سلولایتیک امتناع ورزیده و یا در صورت پذیرش فعالیت های بسیار اندکی از خود بروز داده اند. اما، تحقیقات در این زمینه ادامه داشته تا راه حل مناسبی برای اجرای این هدف طراحی گردد. در صورتیکه بتوان میکروارگانیسم های مقاوم به اسیدیته بالا را دستکاری ژنتیکی نموده تا بتوانند فعالیت های سلولایتیک از خود بروز دهند. امکان مصرف بالای مواد پرتراکم مانند غلات در همراه با علوفه جیره فراهم می آید.

در ادامه فعالیت های دستکاری ژنتیکی میکروب ها محققین به سمت انتقال ژن های تجزیه کننده سموم مصرفی به باکتری های شاخص می باشند. با این روش می توان علاوه بر ادامه فعالیت های تخمیری، میکروب ها و میزبان آنها را در برابر سموم گیاهی بیمه نموده و حتی اقدام به مصرف این سموم به عنوان ماده غذایی نمود. بهترین مثال در این زمینه فعالیت محققین استرالیایی جهت کاهش سم DHP حاصل از مصرف لئوکانئا و مونوفلورواستات موجود در بعضی لگوم ها در شکمبه می باشد. پس از آنکه باکتری شکمبه دام هایی مانند بز و گوسفند به سم مزبور عادت یافته و قادر به هضم آن شدند، آنها را از شکمبه جداسازی و عامل آنزیمی آنها مشخص می شود. پس از شناسایی آنزیم مربوطه و قطعه ژنتیکی که دستور ترشح آن را صادر نموده است، آن را برش و به سایر باکتری های رایج در شکمبه انتقال می دهند. با این شیوه باکتری جدید قادر به هضم سم DHP خواهد بود.

۶-۸ تغییر تولید متان در دستکاری های میکروبی

تولید متان در نشخوار کنندگان نشان دهنده هدر روی انرژی خوراک هضم شده به میزان ۲ تا ۱۲ درصد از انرژی خام (GE) مصرفی می باشد. متان توسط باکتری های متان ساز عمدتاً از هیدروژن، دی اکسید کربن و فورمات تشکیل می شود. تولید روزانه متان در گوسفندان بین ۱۵ تا ۳۰ لیتر (۸ کیلوگرم متان مایع در سال) و در گاوان بین ۲۵۰ تا ۵۰۰ لیتر (۶۰ تا ۱۴۵ کیلوگرم متان مایع در سال) تخمین زده می شود. اگر این میزان از تولید با تعداد فراوان دام های اهلی و وحشی بررسی گردد، میزان آلودگی زیست محیطی این گاز گلخانه ای بیش از اندازه خواهد بود. برای کنترل این میزان گاز تولیدی علاوه بر تغییر گونه های میکروبی شکمبه لازم است کمیت و کیفیت جیره مصرفی، تعداد و توان تولیدی دام ها و محدود کننده های تولید متان مورد بررسی و بازبینی مجدد قرار بگیرد.

۸-۶-۱ تشکیل متان

همانطور که در مباحث قبلی بیان شده است میزان متان تولیدی به سطح خوراک مصرفی، نوع کربوهیدرات جیره، عمل آوری خوراک، اضافه کردن لیپیدها یا یونوفرها به جیره و جمعیت گونه های میکروبی شکمبه (اگر چه متان به طور وسیعی توسط متان سازها تولید می گردد، اما بسیاری از تحقیقات نشان داده اند که متان تولید شده در شکمبه تنها مربوط به جمعیت متان سازها نیست) وابسته می باشد. متان تولید شده منحصرا بوسیله یک گروه میکروارگانیسمی بی نظیر فیلوژنتیکالی مجزا از ائو باکترها (باکتری های واقعی) صورت می گیرد. متان تولید شده در رسوبات دریاچه ها به دلیل ماندگاری بالا (زمانی بیش از ۱۲۰ ساعت) از اسید استیک ساخته می شود. اما متان تولید شده توسط باکتری های متان ساز در زمان کوتاه ۴ تا ۱۲ ساعت شکل می گیرد. با این توضیح می توان نتیجه گرفت که در شکمبه فقط راه دوم امکان پذیر بوده و زمان لازم برای گونه های استی کلاستیک (استات سازی) وجود ندارد. لذا واکنش های عمده تشکیل متان در شکمبه به شکل ذیل انجام می گیرد:

$CO_2 + 4\ H_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O$

$HCOOH + 3\ H_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O$

$4\ HCOOH \rightarrow CH_4 + 3\ CO_2 + 2\ H_2O$

$4\ HCOOH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 4\ CO_2 + 2\ H_2O$

$4\ CH_3CH_2COOH + 2\ H_2O \rightarrow 3\ CH_4 + 4\ CH_3COOH + CO_2$

$2\ CH_3CH_2CH_2COOH + 2\ H_2O + CO_2 \rightarrow CH4 + 4\ CH_3COOH$

$2\ CH_3(CH_2)_3COOH + 2\ H_2O + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2CH_3COOH + 2CH_3CH_2COOH$

با توجه به معادلات فوق می توان گفت تشکیل متان از هیدروژن یک فرآیند اکسیداسیون احیا است. در این فرآیند هیدروژن اکسید و دی اکسیدکربن احیا می شود و متان تولید می گردد. تشکیل متان از فورمات، یک فرآیند دیگری است که فورمات ابتدا به دی اکسیدکربن و هیدروژن تجزیه می

شود و سپس احیای و اکسید آنها باعث تولید متان می شود. اتانول، متان و سایر الکل ها به همراه استات، به عنوان دهنده هیدروژن می توانند سوبسترایی برای تشکیل متان باشند. فرآیند اکسیداتیو در شکمبه معمولاً بسیار کند است. بنابراین این ترکیبات قبل از آنکه به متان تبدیل شوند، در مسیرهای متابولیکی دیگری استفاده قرار می گیرند. هیدروژن و فورمات به عنوان دهندگان هیدروژن می توانند توسط باکتری های شکمبه در سایر مسیرهای متابولیکی برای تولید اسیدهای چرب فرار مانند استات و پروپیونات استفاده شوند. به عنوان مثال؛ اسید مالیک و اسید فوماریک مواد حد واسط مسیر سوکسنیات می باشند که می توانند از هیدروژن برای تولید پروپیونات استفاده کنند. اما فرآیند ساخت استات از متان و دی اکسید کربن به دلیل بالاتر بودن کارآیی ترمودینامیکی از یک امکان پذیر نبوده و در صورت امکان مقدار بسیار کمی از هیدروژن را می تواند کاهش دهد.

۲-۶-۸ عوامل موثر بر تولید متان

اگر چه راه های تشکیل متان مشخص شده است، اما عوامل موثر بر تولید متان متعدد و کنترل همه آنها سخت و دشوار می باشد. مجموعه عوامل موثر بر تولید متان به دو بخش کلی اثرات خوراکی و حیوانی تقسیم می گردد. اثرات خوراکی به مقدار مصرف، ماهیت فیزیکی - شیمیایی خوراک و میزان مصرف مواد شیمیایی و اثرات حیوانی هم به نوع ساختار دستگاه گوارشی موجود باز می گردد. معیارهایی مانند نرخ عبور و زمان ماندگاری مواد غذایی در شکمبه هم که تاثیر بسزایی در تولید متان دارند، در هر دو بخش طبقه بندی شده قابل بررسی هستند. برای تغییر متان تولیدی براساس تقسیم بندی فوق می توان از دو مکانیسم اصلی یعنی (۱) تغییر مقدار کربوهیدرات حاضر در شکمبه که براساس نرخ تخمیر و عبور بیان می گردد، و (۲) میزان هیدروژن ذخیره ای، استفاده کرد. در نهایت مهمترین عوامل موثر بر نرخ تولید متان عبارتنداز:

- **سطح مصرف:** با افزایش مقدار خوراک مصرفی میزان انرژی خام جیره که به صورت متان از دست می رود، با میانگین ۱/۶ درصدی به ازای هر سطح مصرف کاهش می یابد. البته ایجاد ارتباط آماری بین پیش بینی این کاهش با افزایش مصرف در واحد مزرعه ای با مشکلاتی همراه بود. این مشکلات پیش آمده سبب گردید که محققین را قانع نماید تا میزان متان تولیدی را به صورت گرم در روز بررسی نمایند. با این بررسی متوجه شدند که با افزایش سطح تغذیه میزان متان افزایش پیدا می کند. البته افزایش سطح مصرف اگر با افزایش قابلیت تجزیه مواد همراه باشد می تواند مقدار متان تولیدی را کاهش دهد.

• **نوع کربوهیدرات مصرفی:** نوع کربوهیدراتی مصرفی که در شکمبه تخمیر می شود، اغلب از طریق تاثیر بر اسیدیته شکمبه و جمعیت میکروبی بر تولید متان اثر می گذارد. استفاده از کربوهیدرات های ساختاری موجود در دیواره سلولی تخمیر را به سمت تولید بیشتر استات در مقایسه با پروپیونات سوق می دهد. استات بیشتر تولید متان را افزایش داده و انرژی بالاتری از دست می رود. در همین راستا محققین دریافتند که کربوهیدرات های محلول در مقایسه با کربوهیدرات های دیواره سلولی، باعث کاهش بیشتر فعالیت های متان ساز باکتری ها می شود.

• **کیفیت جیره مصرفی:** کیفیت جیره همواره به نسبت اقلام مصرفی و کیفیت هر یک از اقلام وابسته می باشد. استفاده از خوراک های حاوی علوفه فراوان تولید متان را افزایش داده است. البته نوع علوفه مصرفی بر میزان متان تولیدی به شدت موثر بوده و استفاده از علوفه های فقیر از پروتئین مانند گراس ها (برداشت در مرحله آخر رشد) و کاه ها در مقابل لگوم ها مقدار متان بیشتری را تولید می کنند. و بالعکس خوراک حاوی مواد پر تراکم مقدار متان را با افزایش پروپیونات و اسیدیته تولیدی کاهش می دهد. این کاهش بیشتر به دلیل فقدان مواد اولیه ساخت متان و همچنین عدم فعالیت بالای باکتری های متان ساز و پروتوزوئرها در اسیدیته زیاد می باشد.

• **عمل آوری مواد غذایی:** فرآوری فیزیکی مانند آرد و پلت کردن مواد غذایی بخصوص علوفه های مصرفی و یا فرآوری های شیمیایی مانند شکست دیواره سلولی گیاهان با کمک آمونیاک و پختن یا خیساندن میزان تولید متان را کاهش می دهند. البته این عمل آوری زمانی که خوراک محدودی در اختیار دام باشد، بی تاثیر خواهد بود. با افزایش مصرف مواد غذایی و عمل آوری صحیح آنها می توان ۲۰ تا ۴۰ درصد متان تولیدی را کاهش داد. افزایش نرخ عبور علوفه عمل آوری شده (بطور فیزیکی) و قابلیت هضم بالا به دلیل عمل آوری شیمیایی عامل اصلی کاهش متان در هنگام مصرف علوفه است. همچنین فرآوری پروتئینی علوفه های فقیر از لحاظ پروتئین مانند کاه ها می تواند میزان کاهش متان را افزایش دهد.

• **چربی ها:** همانطور که در مباحث قبلی عنوان شده است به دلیل خواص بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب و همچنین کاهش هضم الیاف به دلیل پوشش ایجاد شده توسط چربی ها، اضافه کردن چربی به جیره های غذایی میزان متان تولیدی را کاهش خواهد داد (جدول ۱۰-۸). همچنین چربی ها جمعیت پروتوزوئرهای شکمبه را که مکمل باکتری های متان ساز هستند، را کاهش می دهد (۲۵ درصد متان تولیدی از پروتوزوئرهای مژک دار می باشد). خواص بیوهیدروژناسیون در چربی ها فقط یک درصد هیدروژن تولیدی را در بر گرفته (بیوهیدروژناسیون در مقابل تولید اسیدهای چرب فرار و ساخت سلول میکروبی که ۳۳ و ۱۲ درصد به ترتیب هیدروژن تولیدی را مصرف می کند، ناچیز می باشد) و

چربی تنها با ایجاد یک پوشش جهت کاهش هضم فیبر و اثر سمی مستقیم بر متان سازها، می تواند متان تولیدی را با قدرت زیاد کاهش دهد.

• **سایر افزودنی ها:** افزودنی ها براساس وظایف و ساختار شیمیای ارائه کننده می توانند تولید متان را کاهش دهند. مهمترین افزودنی های شناخته شده جهت کاهش متان تولیدی یونفرها و آنتی بیوتیک های غیر یونفری (با افزایش راندمان مواد غذایی در تخمیر)، باکتریوسین ها (معروف ترین آنها نایسین است)، ترکیبات ثانویه گیاهی (روغن های ضروری و ساپونین ها) و گیرنده های الکترونی در جیره (اسیدهای آلی دی کربوکسیلیک مانند اسید مالیک و فوماریک، پروبیوتیک ها و اکسید کننده های متان) می باشد (جدول ۱۰-۸).

جدول ۱۰-۸ اثر افزودنی ها بر متان تولیدی و تولیدات تخمیری ناشی از مصرف علوفه بالا.

پارامتر	علوفه یونجه فرآوری شده			
	گروه شاهد	فورماریک اسید	روغن ضروری	چربی
اسیدیته شکمبه	۷/۰۷	۶/۹۷	۷/۱۱	۷/۰۹
آمونیاک شکمبه (mM)	۴/۴۵	۵/۴۵	۵/۳۰	۲/۵۲
کل اسیدهای چرب فرار (mM)	۸۵/۴	۹۴	۸۲/۴	۷۸/۴
اسید استیک (درصد)	۶۵/۷	۶۳/۷	۶۵/۳	۵۸/۲
اسید پروپیونیک (درصد)	۱۹/۲	۲۱/۵	۲۰	۲۷/۵
متان تولیدی (g / heifer)	۱۵۹/۳	۱۷۰/۶	۱۶۳/۱	۱۰۸
متان تولیدی (g / kg of DMI)	۲۵/۵	۲۸/۱	۲۷/۵	۲۱/۷

بوشمین و مک گین ۲۰۰۶.

۷-۸ برای مطالعه بیشتر

• افشار مازندران، ن. (۱۳۸۱). پروبیوتیک ها و کاربرد آنها در تغذیه دام و طیور. چاپ دوم. انتشارات نوربخش. تهران.

• خادم، ع. ا.، شریفی، م. (۱۳۸۹). اصول علمی و عملی پرورش گاوهای گوشتی. تالیف. انتشارات دانش نگار. تهران.

• طباطبایی، م. (۱۳۸۲). جنبه های فیزیولوژی تغذیه نشخوارکنندگان. ترجمه. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا. همدان.

• گودرزی، م. (۱۳۷۷). استفاده از زئولیت در جیره گاوشیری نژاد هلشتاین و اثر آن برتولید و ترکیب شیر. پایان نامه کارشناسی ارشد . گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

- قربانی، غ. (۱۳۸۱). ناهنجاری های متابولیکی در گاو. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی. اصفهان.

- Abdl-Rahman, M. A. (2010). In vitro manipulation of rumen fermentation efficiency by fumaric acid bentonite coupled addition as an alternative to antibiotics. Journal of Agricultural Science. Vol. 2, No. 2.
- Acamovic T. J., J. P. F. D'Mello. (1984). Trypsin inhibition by leucaena leafmeal, leucaena seeds and mimosine. Leucaena Research Reports 5:74-75.
- Acamovic, T., C. S. Stewart, T. W. Pennycott. (2004). Poisonous plants and related toxins. Oxford University Press. 608 pp.
- Ahn J. H., B. M. Robertson, R. Elliot, R. C. Guteridge, C. W. Ford. (1989). Quality assessment of tropical browse legumes: Tannin content and protein degradation. Animal Feed Science and Technology 27:147-156.
- Attwood, G. T., J. D. Brooker. (1992). Complete nucleotide sequence of a Selenomonas ruminantium plasmid and definition of a region necessary for its replication in Escherichia coli. Plasmid 28:123-129.
- Beauchemin, A. K., S. M. McGinn. (2006). Methane emissions from beefcattle: Effect of fumaric acid, essential oil ,and canola oil. J. Anim. Sci. 84: 1489-1496.
- Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi and W. Z. Yang. (2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim Sci. 81:E37-47.
- Bergen, W. G., P. S. Dickerson-Weber, M. K. Mater, S. A. Kramer. (1995). Approaches to gene analysis, gene transfer into cells and gene targeting strategies. Journal of Animal Science.
- Beard, C. E., M. A. Hefford, R. J. Forster, S. Sontakke, R. M. Teather, K. Gregg. (1995). Astable and efficient transformation system for Butyrivibrio fibrisolvens OB156. Current Microbiology 30:105-109.
- Bonsi M. L. K., P. O. Osuji, I. V. Nsahlai, A. K. Tuah. (1994). Graded levels of Sesbania sesban and Leucaena leucocephala as supplements to teff straw given to Ethiopian Menz sheep. Animal Production 59:235-244.
- Brock, F. M., C. W. Forsberg, J. G. Buchanan-Smith. (1982). Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. Applied and Environmental Microbiology 44:561-569.
- Brooker, J. D., D. K. Lum. (1993). Use of transposon Tn916 as a genetic marker in the rumen. Letters in Applied Microbiology 17:224-227.

- Brooker, J. D., L. A. O'Donovan, I. Skene, K. Clarke, L. Blackall, P. Muslera. (1994). Streptococcus caprinus sp nov, a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. Letters in Applied Microbiology 18:313-318.
- Broudiscou, L., J. P. Jouany. (1995). Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. Reprod. Nutr. Dev. 35:517–535.
- Burdett, V. (1990). Nucleotide sequence of the Tet (M) gene of Tn 916. Nucleic Acids Research 18: 6137.
- Callaway,T. R., T. S. Edrington, J. L. Rychlik, K. J. Genovese, T. L. Poole, Y. S. Jung, K. M. Bischoff, R. C. Anderson, D. J. Nisbet. (2003). Ionophores: Their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. Curr. Issues Intest. Microbiol. 4: 43-51.
- Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, A. Ferret. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90:2580–2595.
- Chalupa, W. (1977). Manipulating rumen fermentation. J Anim Sci. 45:585-599.
- Cocconcelli, P. S., E. Terrari, F. Rossi, V. Bottazzi. (1992). Plasmid transformation of Ruminococcus albus by means of high-voltage electroporation. FEMS Microbiology Letters 941:203-208.
- Duncan, A. J., P. Frutos, S. A. Young. (1997) Rates of oxalic acid degradation in the rumen of sheep and goats in response to different levels of oxalic acid administration. Animal Science 65, 451–456.
- Fabiny, J. M., A. Jayakumar, A. C. Chinault, E. M. Barnes. (1991). Ammonium transport in Escherichia coli: localization and nucleotide sequence of the Amt A gene. Journal of General Microbiology 137:983-989.
- Faixova, Z., S. Faix. (2002). Influence of metal ions on ruminal enzyme activities. Acta Vet. Brno, 71: 451–455.
- Fernandez-Rivera, S. (1994). Seasonal variation in the microbial digestive activity, rumen ammonia concentration and diet ingested by grazing ruminants in the Sahel. Proceedings of the Society of Nutrition and Physiology 3:324.
- Forsberg, C. W., B. Crosby, D, Y. Thomas. (1987). Potetial for manipulation of the rumen fermentation through the use of reco mbinant DNA techniques. J. Anim. Sci. 1986.63:310-325.
- Forsberg, C. W., (1978). Effects of heavy metals and other trace elements on the fermentative activity on the rumen microflora and growth of functionally important rumen bacteria. Can. J.Microbiol, 24, 298-306.

- Frumholtz, P. P. (1991). Manipulation of the rumen fermentation and its effect on digestive physiology. A Thesis. University of Aberdeen.
- Gaggìa, F., P. Mattarelli, B. Biavati. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International J. Food Microbiology 141:15–28.
- Garrido A., A. Gomez-Cabrera, J. E. Guerrero, J. M. Van der Meer. (1991). Effect of treatment with polyvinylpyrridone and polyethylene glycol on faba bean tannins. Animal Feed Science and Technology 35:199.
- Gregg, K., H. Sharpe. (1991). Enhancement of microbial detoxification by gene transfer. In: Tsuda T., Sasaki Y. and Kawashima R. (eds), Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants. Proceedings of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology, Sendai, Japan, 28 August 1 September 1989. Academic Press, San- Diego, California, USA. pp. 718-735.
- Gregg, K., C. E. Ware. (1990). Importance of genetic diversity in manipulation of rumen bacteria. In: Akin D., Ljungdahl L., Wilson J. and Harris P. (eds), Microbial and Plant Opportunities for Improvement of Lignocellulose Utilization by Ruminants. Academic Press, New York, USA. pp. 357-366.
- Gregg, K., G. Allen, T. Bauchop, A.V. Klieve, M. Lincoln. (1993). Practical genetic manipulation of rumen bacteria. In: Farrell D. J. (ed), Recent Advances in Animal Nutrition in Australia. University of New England, Armidale, Australia. pp. 13-21.
- Hammond, A. C. (1995). Leucaena toxicosis and its control in ruminants. J. Anim Sci. 73:1487-1492.
- Hart, K. J., D. R. Yanez-Ruiz, S. M. Duval, N. R. McEwan, C. J. Newbold. (2007). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.09.007.
- Hassan S. M. (1994). Yeast culture and multipurpose fodder trees as feed supplements for ruminants.’ Ph.D thesis, University of Aberdeen, Aberdeen, UK.
- Hemken R. W., J. A. Jackson, Boling J. A. (1984). Toxic factors in tall fescue. Journal of Animal Science 58:1011.
- Hobin, M. R. (2009). Manipulation of ruminal fermentation to alter milk fatty acid composition dairy cows. A Thesis. University of Saskatchewan.
- Hucko, B., V.A. Bampidis, A. Kodes, V. Christodoulou, Z. Mudrik, K. Polakova, V. Plachy. (2009). Rumen fermentation characteristics in pre-

weaning calves receiving yeast culture supplements. Czech J. Anim. Sci., 54: 435–442.

- Johnson, K. A., D. E. Johnson. (1995). Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 73: 2483-2492.
- Jones, R. J., R. G. Megarrity. (1986). Successful transfer of DHP degrading bacteria from Hawaiian goats to Australian ruminants to overcome the toxicity of Leucaena. Australian Veterinary Journal. 63:259-262.
- Jouany, J. P. (1994). Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. Ann Zootech. 43:49-62.
- Khampa, S., M. Wanapat. (2007). Manipulation of rumen fermentation with organic acids supplementation in ruminants raised in the tropics. Pakistan Journal of Nutrition, 6 (1): 20-27.
- Kohn, R. A., T. F. Dunlap. (1998). Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro. J. Anim Sci. 76:1702-1709.
- Lana, R. P., J. B. Russell, M. E., Van Amburgh. (1998). The role of pH in regulating methane and ammonia production. J. Anim. Sci. 76: 2190-2196.
- Mackie, R. I., B. A. White. (1990). Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. Journal of Dairy Science 73:2971–2995.
- Martin, S. A. (1998). Manipulation of rumen fermentation with organic acids: a review. J. Anim Sci. 76: 3123-3132.
- McAllister, T. A., A. N. Hristov, K. A. Beauchemin, L. M. Rode, K. J. Cheng. (2001). Enzymes in ruminant diets. Dep. of Animal Sci, University of British Columbia, Vancouver, BC V6T 1Z4.
- McCosker, T. H. (1989). Ruminal detoxification of fluoroacetate. Agricultural Science (New Series). 2:46-47.
- McGarvey, J. A., W. H. Scott, J. D. Edward, M. M. Frank. (2010). Effect of dietary monensin on the bacterial population structure of dairy cattle colonic contents. Appl Microbiol Biotechnol 85:1947–1952.
- McLeod, M. N. (1974). Plant tannins their role in forage quality. Nutrition Abstracts and Reviews 44:803-15.
- Mumpton, F. A., P. H. Fishman. (1977). The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. J. Animal Sci., 45:1188-1203.
- Nagaraja, T. G., C. J. Newbold, C. J. Van Nevel, D. I. Demeyer. (1997). Manipulation of ruminal fermentation. Pages 523-632. In The Rumen

Microbial Ecosystem. Ed., P. N. Hobson and C. S. Stewart. Blackie Academic & Professional. London, UK.

- Nik-khah, A., M. Goodarzi, S. R. Miraei-Ashtiani. (2000). Effect of various levels of zeolite on milk yield, milk composition and pH of rumen and feces. Iranian J. Agric. Sci. Vol 31. No 2.
- Ørskov, E. R. (1991). Manipulation of fibre digestion in the rumen. Proceedings of the Nutrition Society 50:187-196.
- Parker, D. S. (1990). Manipulation of the functional activity of the gut by dietary and other means (Antibiotics / Probiotics) in ruminants. Sym. J. of Nutrition. 639-648.
- Pelchen, A., K. J. Peters. (1998). Methane emissions from sheep. Small Ruminant Research. 27: 137-150.
- Quispe M. E., H. Barradas, R. M. Cook. (1991). Effects of isoacids, urea and sulfur on ruminal fermentation in sheep fed pineapple tops. Small Ruminant Research 6:49.
- Reed, J. D. (1986). Relationships among soluble phenolics, insoluble proanthro-cyanidins and fibre in East Africa browse species. Journal of Range Management 39:5-7.
- Russell, J. B., J. M. Chow. (1993). Another theory for the action of ruminal buffer salts: Decreased starch fermentation and propionate production. J. Dairy Sci. 76:826-830.
- Russell J. B., H. J. Strobel, S. A. Martin. (1990). Strategies of nutrient transport by ruminal bacteria. Journal of Dairy Science 73:2996-3012.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. 1546 pp.
- Selinge, L. B., C. W. Forsberg, K.J. Cheng. (1996). The rumen: A unique source of enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe. 2: 263–284.
- Tucker, W. B., M. Aslam, M. Lema, I. S. Shin, P. L. Ruyet, J. F. Hogue, D. S. Buchanan, T. P. Miller, G. D. Adams. (1992). Sodium bicarbonate or multielement buffer via diet or rumen: effects on performance and acid-base status of lactating cows. J. Dairy Sci. 75:2409-2420.
- Varadyova, Z., K. Mihalikova, S. Kisidayova, P. Javorsky. (2006). Fermentation pattern of the rumen and hindgut inocula of sheep grazing in an area polluted from the non-ferrous metal industry. Czech J. Anim. Sci., 51: 66–72.
- Wallace, R. J., A. Lahlou-Kassi. (1995). Rumen ecology research planning. Proceedings of a workshop held at ILRI. Addis Ababa, Ethiopia. ISBN 92-9146-005-2.

- Wallace, R. J. (1994). Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. J. Anim Sci. 72:2992-3003.
- Wanapat, M., A. Cherdthong, P. Pakdee, S. Wanapat. (2008). Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass. J Anim Sci.86:3497-3503.
- Weimer, P. J. (1998). Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. J. Anim. Sci. 76:3114–3122.
- Whitehead, T. R. (1992). Genetic transformation of the ruminal bacteria Butyrivibrio fibrisolvens and Streptococcus bovis by electroporation. Letters in Applied Microbiology 15:186-189.
- Whitlow, L. W., W. M. Hagler. (2005). Mycotoxins: A review of dairy concerns. Mid-South Ruminant Nutrition Conference.

فصل نهم

ضمائم

۱–۹ واژه نامه ۴۴۶

واژه نامه

ADF	Acid Detergent Fiber	فیبر محلول در شوینده اسیدی
ADIN	Acid Detergent Insoluble Protein	نیتروژن غیر محلول در شوینده اسیدی
ADP	Adenosine Di Phosphate	آدنین حاوی دو فسفات پر انرژی
ATP	Adenosine Tri Phosphate	آدنین حاوی سه فسفات پر انرژی
DHP	D-Hydroxy Pyridine	۲ هیدروکسی ۳ پیریدین
DMI	Dry Matter Intake	ماده خشک مصرفی
DMP	Digestable Microbial Protein	پروتئین میکروبی قابل هضم
DNA	Deoxyribo Nucleoic Acid	دزوکسی ریبونوکلوئیک اسید
DUP	Digetable Undegredable Protein	پروتئین غیر قابل تجزیه قابل هضم
EMCP	Efficiency Microbial Crude Protein	کارآیی پروتئین خام میکروبی
ERDP	Efficiency Rumen Degradable Protein	پروتئین موثر قابل تجزیه در شکمبه
FME	Fermentation Metabolizable Energy	انرژی قابل تخمیر
GE	Gross Energy	انرژی خام
HCN	Hydrocyanic Acid	اسید هیدروسیانیک
HPLC	High Performance Liquid Chromatogeraphy	کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا
LCFA	Long Chain Fatty Acids	اسیدهای چرب بلند زنجیره
MCP	Microbial Crude Protein	پروتئین خام میکروبی
MCTP	Microbial Crude True Protein	پروتئین واقعی میکروبی
ME	Metabolize Energy	انرژی متابولیسمی
MRT	Mean Retention Time	زمان ماندگاری خوراک
NAD^+	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	نیکوتین آمید آدنین دی نوکلوتید
NDF	Neutral Detergent Fiber	فیبر محلول در شوینده خنثی
NDIN	Neutral Detergent Insoluble Protein	نیتروژن غیر محلول در شوینده بازی
NPN	Non Protein Nitrogen	ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی
PABA	Para Banzoic Amino Acid	پارا آمینو بنزوئیک اسید
PCR	Polymerase Chain Reaction	واکنش زنجیره پلیمراز
RDP	Rumen Degradable Protein	پروتئین قابل تجزیه در شکمبه
RNA	Ribo Nucleoic Acid	ریبونوکلوئیک اسید
RS	Resistant Spore	هاگ های مقاوم

RUP	Rumen Undegradable Protein	پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه
RUSITEC	Rumen Stimulation Technic	تکنیک شبیه سازی شکمبه
SID	Storang Inion Difference	تفاوت قدرت یونی
TDN	Total Digestible Nutrient	مجموع مواد مغذی قابل هضم
TP	True Protein	پروتئین حقیقی
UDP	Undegredable Protein	پروتئین غیر قابل هضم و تجزیه
VFA	Volatile Fatty Acids	اسیدهای چرب فرار