مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۳ شماره ۳/ سال۱۴۰۲/ صفحات ۸۳ تا ۹۸
DOI: 10.22034/AS.2023.52119.1667

استفاده از تعدادی از باکتری‌های تولید کننده تاناز برای کاهش تانن و بهبود ارزش تغذیه‌ای برگ اکالیپتوس

زهرا جهان‌آرا[۱]، مرتضی چاجی[۲]* و امید خراسانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۷

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
[۲] استاد گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
[۳] دکتری تغذیه‌دام، هنرستان خوارزمی دزفول، خوزستان، دزفول ایران
* مسئول مکاتبه: Email: chaji@asnrukh.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: مصرف گیاهان حاوی تانن احتمالا فعالیت باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها تجزیه کننده سلولز در شکمبه را محدود کرده و قابلیت هضم الیاف خام و انرژی قابل متابولیسم را کاهش می‌دهد؛ درکنار اثرات ضد تغذیه‌ای تانن در غلظت زیاد، اثرات مثبت تانن‌های متراکم در غلظت بهینه شامل بهبود افزایش وزن زنده، افزایش تولید شیر، افزایش نرخ تخمک‌ریزی و درصد بره‌زایی و کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی و متان در شکمبه می‌باشد. **هدف**: پژوهش حاضر با هدف استفاده از باکتری‌های تولید کننده تاناز برای بهبود ارزش تغذیه‌ای برگ اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) انجام گرفت. در ابتدا برگ اکالیپتوس با چهار نوع از باکتری‌های تجزیه کننده‌ی تانن (*لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جدا شده از شکمبه‌ی بز نجدی، *کلبسیلا پنومونیه*، *اسینتو باکتر* و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم تجاری*) عمل‌آوری شد. سپس ارزش تغذیه‌ای برگ اکالیپتوس به تنهایی و یا به صورت ترکیب در یک جیره‌ی بره‌ی پرواری با روش هضم دو مرحله‌ای و آزمایش تولید گاز مورد مطالعه قرار گرفت. **روش کار**: تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- برگ اکالیپتوس و یا جیره‌ی حاوی آن بدون عمل آوری (شاهد)، تیمار ۲ تا ۵- برگ اکالیپتوس یا جیره‌های حاوی آن که با هریک از چهار باکتری‌های تجزیه کننده تانن عمل‌آوری شدند. **نتایج**: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر پتانسیل تولید گاز، نرخ تولید گاز، ماده آلی واقعا تجزیه شده و تولید توده‌ی زنده میکروبی برگ اکالیپتوس و جیره‌های حاوی آن معنی‌داری بود (P<۰/۰۵). پتانسیل تولید گاز همه‌ی تیمارهای آزمایشی بیشتر از شاهد بود (P<۰/۰۵). قابلیت هضم ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده‌ی خنثی و اسیدی برگ اکالیپتوس و جیره‌های حاوی آن در همه‌ی تیمارها به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). تاثیر تیمارهای آزمایشی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH و جمعیت پروتوزوآی مایع شکمبه برگ اکالیپتوس و جیره‌های حاوی برگ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). **نتیجه گیری نهایی**: نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از باکتری‌های تولید کننده‌ی تاناز باعث تجزیه‌ی تانن برگ شد و کیفیت آن را بهبود بخشید، لذا استفاده از آنها می‌تواند راهکار مناسبی برای کاهش تانن و بهبود ارزش غذایی برگ اکالیپتوس برای دام باشد.

واژگان کلیدی: بازده تولید توده‌ی زنده‌ی میکروبی، پروتوزوآ، تانن، تولید گاز، نیتروژن آمونیاکی، هضم‌پذیری

مقدمه

اکالیپتوس که در فارسی بیدبویه یا پَشه رَم نیز نامیده می‌شود، از جنس اکالیپتوس و متعلق به خانواده میرتاسه یا موردیان می‌باشد، و شامل بیش از ۷۰۰ گونه است که در ایران بیشتر جنس و گونه‌ی *اکالیپتوس کامالدولنسیس*[۱] وجود دارد (مکفیل و تورنهیل ۲۰۱٦). دارای رشد سریع و نیاز کم به آب است، اکالیپتوس درختی همیشه سبز و غیربومی می‌باشد و چوب درخت اکالیپتوس بسیار سخت و مقاوم است. گونه‌های مختلف اکالیپتوس در بیشتر از ۸۵ کشور جهان در مساحتی حدود ٦۵ میلیون هکتار به طور گسترده و با اهداف مختلف کشت می‌شوند (مکفیل و تورنهیل ۲۰۱٦). بیشترین پراکنش جهانی اکالیپتوس در استرالیا است، در ایران نیز در مناطق گرمی مثل بندر عباس و بویژه بیشتر مناطق خوزستان کاشته می‌شود (عصاره و همکاران ۲۰۱۰). برگ‌های اکالیپتوس دارای تانن، فلاونوئیدها و روغن‌های فرار یا اسانسی می‌باشد و بعضی از ترکیبات آن دارای فعالیت بیولوژیک از جمله آنتی اکسیدان می‌باشد (اصغری و مظاهریانی ۲۰۱۰)؛ ترکیبات پلی فنلی برگ‌های اکالیپتوس بویژه تانن آن ممکن دارای اثرات ضد تغذیه‌ای باشد بنابراین، در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری، فرآوری درختان غنی از تانن با تاناز در سیستم‌های تغذیه حیوانات بسیار مهم است (محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۰).

تانن‌ها بسته به غلظت و ماهیت آن‌ها، گونه‌های حیوانی، وضعیت فیزیولوژیکی حیوان و ترکیب جیره دارای اثرات مفید و مضری می‌باشند. تانن‌های قابل هیدرولیز معمولاً توسط آنزیم‌های میکروفلورای شکمبه تجزیه می‌شوند، اما تانن‌های متراکم بسیار گسترده هستند و نسبت به تانن‌های قابل هیدرولیز کمتر مستعد هیدرولیز می‌باشند (دوبی و همکاران ۲۰۱۱). با افزایش مقدار تانن، قابلیت هضم پروتئین‌ها کاهش می‌یابد. تانن‌ها می‌توانند سبب ممانعت از فعالیت میکروب‌ها شده و باعث عدم فعالیت اندوگلوکوناز خارج سلولی در برخی باکتری‌های هضم کننده الیاف شوند. تانن‌ها از هضم مواد لیگنوسلولزی که وابسته به آنزیم‌های خارج سلولی است جلوگیری کرده مانع اتصال میکروب‌ها به ذرات غذایی و کاهش قابلیت هضم آنها و ماندگاری بیشتر آنها در شکمبه می‌شود (بابادی و همکاران ۲۰۱۸). کاهش pH با مصرف گیاهان حاوی تانن احتمالا فعالیت باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها تجزیه کننده سلولز در شکمبه را محدود کرده و قابلیت هضم الیاف خام و انرژی قابل متابولیسم را کاهش می‌دهد (خوافی پور و همکاران ۲۰۰۹). درکنار اثرات ضد تغذیه‌ای تانن در غلظت زیاد، اثرات مثبت تانن-های متراکم در غلظت بهینه شامل بهبود افزایش وزن زنده، جلوگیری از نفخ، افزایش تولید شیر، افزایش نرخ تخمک‌ریزی و درصد بره‌زایی، کاهش نماتودهای روده‌ای و کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی و متان در شکمبه می-باشد (لیم و مورتیجایا ۲۰۰۷).

استفاده از روش‌هایی که بتواند مقدار تانن را کاهش دهد، باعث می‌شود بتوان از گیاهان تانن‌دار به مقدار بیشتر و موثرتری در تغذیه‌دام استفاده کرد (هوانگ و همکاران ۲۰۱۸). در کنار روش‌های شیمیایی و سایر روش‌ها برای تانن‌زدایی، روش‌های بیولوژیکی نیز وجود دارد (چاجی و همکاران۲۰۲۰; محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۰). در نشخوارکنندگانی نظیر گاو، گوسفند و بز میکروارگانیسم‌هایی نظیر *استرپتوکوکوس بویس*، *استرپتوکوکوس کاپرینوس*، *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* و *سلونوماناس رومینانتیوم* شناسایی شدند که در تجزیه زیستی تانن شرکت دارند (هیورا و همکاران ۲۰۱۰). بعلاوه، گزارشات زیادی در مورد توانایی تولید تاناز توسط باکتری *کلبسیلا پنومونیه* نیز وجود دارد که تاناز تولیدی آن در محدوده pH اسیدی ٤/۵ تا ۵/۵ ثبات بالاتری دارد (کومار و همکاران ۲۰۱۵). *کلبسیلا پنومونیه* و اسینتو باکتر به عنوان تجزیه کننده‌های تانن جداسازی

[۱] Eucalyptus camaldulensis

شده از شکمبه گوزن، فراسنجه‌های تخمیر برگ کنوکارپوس و اکالیپتوس را بهبود دادند، بنابراین استفاده از این جدایه‌ها برای ارتقای ارزش تغذیه‌ای گیاهان حاوی تانن مفید خواهند بود (محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۱). لاکتوباسیل‌ها یکی از باکتری‌های مهم تولیدکننده اسیدلاکتیک هستند که در صنعت برای مصارف گوناگون استفاده می‌شود (نوروزی و همکاران ۲۰۰۸). با هدف بررسی اثر تخمیری سه باکتری بر تجزیه و تحلیل سطوح تانن و اسید فیتیک در آرد سورگوم، باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم باعث کاهش ۳۳/۶۹ درصدی در تانن شد (ستی‌روتو و وجیست‌چیتی ۲۰۱۶).

با توجه به فراوانی برگ‌های اکالیپتوس در مناطق مختلف کشور به ویژه استان خوزستان، می‌توان استفاده از آن برای خوراک دام را مورد توجه قرار داد. اما وجود تانن در این گیاه ممکن است مقدار استفاده از آن در جیره‌ها را محدود کند، لذا تانن‌زدایی آن می‌تواند باعث افزایش مصرف این گیاه در تغذیه دام‌ها شود. بر این اساس، آزمایش حاضر با هدف بررسی اثر تعدادی از باکتری‌های تولید کننده‌ی تاناز (*کلبسیلا پنومونیه*، اسینتوباکتر، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* تجاری) درکاهش تانن و بهبود ارزش تغذیه‌ای برگ اکالیپتوس انجام شد.

مواد و روش‌ها

برگ‌های اکالیپتوس مورد استفاده، از درختان اکالیپتوس واقع در منطقه ملاثانی و دانشگاه جمع آوری شد. برگ‌ها به صورت تازه و به قطعات ٤-٣ سانتی متری خرد شدند و در سایه و در جریان هوای خشک شدند. باکتری‌های تجزیه کننده‌ی تانن مورد استفاده در آزمایش حاضر از شکمبه گوزن و بز نجدی جداسازی شدند و توانایی تولید تاناز و تانن‌زدایی آنها قبلا در آزمایشاتی بررسی شده است (چاجی و همکاران ۲۰۲۰؛ محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۰؛ محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۱). باکتری‌های تجزیه کننده تانن مورد استفاده در آزمایش حاضر شامل *کلبسیلا پنومونیه* (10^7 cfu/ml) و گونه‌های مختلف اسینتو باکتر (10^7 cfu/ml) جدا شده از شکمبه گوزن، *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* (10^7 cfu/ml) جدا سازی شده از شکمبه بز نجدی و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری (10^7 cfu/ml) بودند.

آماده سازی مایع تلقیح باکتریای‌ها

یک قسمت از هر جدایه باکتریایی (غیر از *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری)، به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی مواد مغذی (نوترینت براث) اضافه شد و ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد، محیط کشت حاصل مجدد به یک لیتر محیط نوترینت براث اضافه شد و ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و برای عمل‌آوری برگ اکالیپتوس استفاده شد (محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۱).

آماده سازی مایع تلقیح فرمنتوم تجاری: یک بخش از باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس روی پلیت حاوی محیط کشت MRS- آگار کشت داده شد، سپس مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از آن (یک کلنی از باکتری) به محیط کشت MRS منتقل شده و برای ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد و برای عمل آوری برگ اکالیپتوس استفاده شد (بابادی و همکاران ۲۰۱۸؛ چاجی و همکاران ۲۰۲۰).

به‌طور خلاصه، جهت عمل آوری مقدار ۱۰ کیلوگرم برگ اکالیپتوس پس از تبدیل آن‌ها به قطعات ۳-٤ سانتی‌متری، در ۱۰ لیتر آب مقطر حاوی ۱ لیتر محلول نوترینت براث حاوی هر یک از باکتری‌های مورد آزمایش به نحوی که تعداد سلول (10^7 cfu/ml) باشد قرار داده شدند (در مورد *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری محیط کشت MRS که پیش از این روش تهیه آن شرح داده شد) و بلافاصله به کیسه‌های پلاستیکی منتقل و جهت بی‌هوازی شدن محیط، درب آن‌ها بسته و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند که پس از خارج شدن از کیسه‌ها، خشک و آسیاب شدند و به صورت مخلوط با

جیره به بره‌ها داده شدند (محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۱). برای فرآوری با هر باکتری چهار تکرار در نظر گرفته شد که ۳ تکرار برای آنالیز استفاده شد.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی: ترکیبات شیمیایی برگ اکالیپتوس شامل پروتئین خام (کجلدال خودکار، مدل V50، صنایع آزمایشگاهی بخشی، تهران، ایران)، چربی خام (سوکسله)، ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADFom)، خاکستر و تانن کل با روش استاندارد با سه تکرار اندازه‌گیری شد (AOAC 2012). اندازه‌گیری الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDFom) نیز بدون استفاده از آنزیم آلفا آمیلاز و سولفیت‌سدیم و با حذف خاکستر با سه تکرار انجام شد (ون سوست و همکاران ۱۹۹۱).

تیمارهای آزمایشی

آزمایش اول (ارزش تغذیه‌ای برگ اکالیپتوس به تنهایی)، پنج تیمار آزمایشی شامل ۱- شاهد (برگ اکالیپتوس خام یا عمل آوری نشده)، ۲- برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، ۳- برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری اسینتو باکتر (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، ٤- برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* (جدا سازی شده از شکمبه بز نجدی)، ٥- برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری، بودند.

آزمایش دوم (ارزش تغذیه‌ای جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس)، با برگ اکالیپتوس خام یا عمل آوری شده با هر کدام از چهار باکتری‌های تجزیه کننده تانن، جیره‌های آزمایشی مخصوص بره‌های پرواری حاوی ٦٠ درصد کنسانتره و٤٠ درصد علوفه تهیه شد (NRC 2007). در این مرحله از ٥ تیمار آزمایشی استفاده شد: تیمار ۱- جیره‌ی شاهد (حاوی برگ اکالیپتوس خام یا عمل آوری نشده)، تیمار ۲- جیره‌ی حاوی برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، ۳- جیره‌ی حاوی برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری اسینتو باکتر (جداسازی شده از شکمبه گوزن)، ٤- جیره‌ی حاوی برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* (جدا سازی شده از شکمبه بز نجدی)، ٥- جیره‌ی حاوی برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری (جدول ۱).

آزمایش تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه

مقدار گاز تولیدی و فراسنجه‌های تخمیر برگ اکالیپتوس و جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری‌های تجزیه کننده تانن با روش تولید گاز اندازه گیری شد (منک و استینگز ۱۹۸۸). قبل از وعده غذایی صبح از چهار راس گوسفند تغذیه شده با جیره‌ی علوفه‌ای مایع شکمبه گرفته شد و بعد اختلاط بلافاصله توسط پارچه نخی متقال صاف شد. سپس در ظرف آب گرم در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شد. در ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری (تعداد ۸ ویال یا تکرار برای هر تیمار در هر بار (ران) آزمایش) مقدار ۰/۲ گرم نمونه ریخته شد. مقدار ۲۰ میلی‌لیتر بافر و ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه (نسبت ۲ به ۱) به هر ویال اضافه شد. تولید گاز در زمان‌های صفر، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۹٦ ساعت ثبت شد. آزمایش سه بار تکرار (ران) شد و در هر بار با استفاده از مدل نمایی تغییر یافته (اورسکوف و مک دوناالد ۱۹۷۹) ضرایب تولید گاز محاسبه شدند. در نهایت ضرایب حاصل (تعداد سه ضریب برای هر تیمار) با استفاده از طرح کاملا تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند.

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

در این معادله، P = تولید گاز، b = پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر)، c = ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، t = مدت زمان انکوباسیون (ساعت)، e = عدد نپری بود. فراسنجه‌های تخمیری برای هر تیمار در هر بار (ران) آزمایش (تعداد ٥ ویال یا تکرار برای هر تیمار در هر بار آزمایش) شامل عامل جداکننده (PF)، تولید توده زنده میکروبی با رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه شدند (بلومل و همکاران ۱۹۹۷):

(رابطه‌ی ۱) عامل تفکیک (mg ml-1) = میلی‌گرم ماده آلی واقعا تجزیه شده ÷ میلی‌لیتر گاز تولیدی در ۲٤ ساعت.

(رابطه‌ی ۲) تولید توده زنده میکروبی (میلی‌گرم) = گاز تولیدی در ۲٤ ساعت × (۲/۲- عامل تفکیک)

(رابطه‌ی ۳) بازده تولید توده زنده میکروبی = تولید توده میکروبی ÷ ماده آلی واقعا تجزیه شده

آزمایش قابلیت هضم

قابلیت هضم مواد مغذی برگ اکالیپتوس و جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری‌های تجزیه کننده تانن به روش هضم دو مرحله‌ای تعیین شدند. مایع شکمبه مانند آزمایش تولید گاز تهیه شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه و ٤۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی مخلوط شدند (نسبت ۱ به ٤) و در لوله‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری (هشت لوله (تکرار) برای هر تیمار آزمایشی) در بن ماری ۳۹ درجه سلسیوس قرار داده شد (تیلی و تری ۱۹٦۳). در ٤۸ ساعت بعد، به محیط کشت اسید کلریدیک ۲۰ درصد و آنزیم پپسین اضافه شد (۰/۵ گرم آنزیم پپسین ۳۳۰۰ در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال). لوله‌ها به مدت ٤۸ ساعت دیگر در حمام آب گرم قرار داده شدند. در پایان روز چهارم، از اختلاف وزن نمونه اولیه و باقیمانده، پس از خشک کردن آنها در آون (۹۰ درجه سلسیوس، ۲٤ ساعت) قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF اندازه‌گیری شد. داده‌های قابلیت هضم (تعداد هشت داده برای هر تیمار) با استفاده از طرح کاملا تصادفی مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

شمارش پروتوزوآ

جهت شمارش پروتوزوآ، در پایان ساعت ۲٤ در محیط کشت گاز از تعداد سه ویال نمونه تهیه شد. برای ثابت کردن پروتوزوآ، ۱۰ میلی‌لیتر مایع محیط کشت میگروارگانیسم‌های شکمبه با ۱۰ میلی‌لیتر فرم آلدهید ۱۰ درصد مخلوط و با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش پروتوزوآها برای هر ویال سه بار تکرار شد (دهوریتی ۲۰۰۳). مجموع داده‌های حاصل (تعداد نه داده برای هر تیمار) با استفاده از طرح کاملا تصادفی مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH شکمبه

به منظور تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی در پایان ساعت ۲٤ از محیط کشت گاز از تعداد سه ویال نمونه تهیه شد. بلافاصله pH آن با دستگاه pH متر (مدل WTW 3110، ساخت آلمان) اندازه‌گیری شد. پس از صاف کردن با پارچه متقال چهار لایه به مقدار مساوی با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال (۱٦/۷ میلی‌لیتر اسید کلریدریک مرک ۳۷ درصد در یک لیتر آب مقطر) مخلوط شد و جهت اندازه‌گیری بعدی در دمای۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی برای هر ویال با سه تکرار با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (مدلBio-Ra Libra S22 ساخت انگلستان) اندازه‌گیری شد (برودریک و کانگ ۱۹۸۰). داده‌های حاصل (تعداد نه داده برای هر تیمار) با استفاده از طرح کاملا تصادفی مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

همه‌ی داده‌های حاصل با نرم افزار آماری SAS (نسخه‌ی ۹/٤) با مدل خطی GLM در قالب یک طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ درصد انجام گرفت. از مدل آماری زیر استفاده شده است

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

که در این مدل، Y_{ij} مقدار مشاهده شده، μ میانگین جامعه، T_i اثر تیمار iام، ε_{ij} خطای آزمون است.

Table 1- Feed ingredients and chemical composition of the experimental diets containing eucalyptus leaves

Ingredients (% of DM)	Untreated	Treated[1]
Alfalfa hay	15	15
Wheat straw	25	25
Barley grain	20	20
Corn grain	3.5	3.5
Soybeans meal	15	15
Eucalyptus leaf	20	20
Salt	0.5	0.5
Vitamin and mineral supplements[2]	1.0	1.0
Chemical composition (%)		
Organic matter	93.0	93.0
Crude protein	13.51	13.40
NDF	38.58	38.52
ADF	27.06	27.01
ME (Mcal/kg DM)	2.44	2.44

[1]Tannin-degrading bacteria include *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.
[2]Premix contained (per kg): Vitamin A, 500,000 IU/mg; vitamin D3, 100000 IU/mg; vitamin E, 100 mg/kg; Ca, 180 g/kg; P, 60000 mg/kg; Na, 60000 mg/kg; Mg, 19000 mg/kg; Zn, 3000 mg/kg; Fe, 3000 mg/kg; Mn, 19000 mg/kg; Cu, 300 mg/kg; Co, 100 mg/kg; Se, 1 mg/kg; I, 100 mg/kg; antioxidant, 400 mg/kg; carrier, up to 1000 g.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی برگ اکالیپتوس

ترکیب شیمیایی برگ اکالیپتوس در دو حالت بدون عمل‌آوری و عمل‌آوری شده با باکتری‌های مختلف تولید کننده‌ی تاناز در جدول ۲ آمده است. در آزمایش حاضر مقدار پروتئین، NDF، ADF و تانن کل، برگ اکالیپتوس عمل‌آوری نشده (شاهد) به ترتیب ۸/۸۱، ٦١/٦٩، ٤٨/٧٣، ٦/٥٩١ بود (جدول ۲). مشابه با نتایج آزمایش حاضر، در پژوهشی در تغذیه دام و طیور مقدار پروتئین خام، NDF و ADF برگ تازه اکالیپتوس به ترتیب ٧/٦٤، ٦١/٦٢ و ٥٠/٤ درصد گزارش شد (رحمانی و همکاران ۲۰۱۹). در پژوهشی مقدار تانن کل اکالیپتوس ۷/۲۲ درصد گزارش شد (ش و همکاران، ۲۰۱۸) که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد. معمولا علت اختلاف در نتایج ترکیب شیمیایی انواع اکالیپتوس گونه، محل کاشت، آب و هوا، نوع خاک، سن برگ‌ها و روش استفاده شده برای خشک کردن گیاه بیان شده است (بروکر و همکاران ۲۰۰٦)؛ هرچند بین نتایج ذکر شده با نتایج آزمایش حاضر تفاوتی چندانی مشاهده نشد.

استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده‌ی تانن (تولید کننده‌ی تاناز) در عمل آوری برگ اکالیپتوس، به غیر از کاهش ۳۸ درصدی غلظت تانن ($P<0/05$)، تاثیر معنی‌داری بر ترکیب شیمیایی آن نداشت (جدول ۲). علت کاهش غلظت تانن، تجزیه آن توسط باکتری‌های تجزیه کننده تانن می‌باشد (پاول و همکاران ۲۰۰۳). تخمیر کنجاله کانولای عمل‌آوری شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم به طور متوسط غلظت تانن را ٤٤/٥ درصد نسبت به شاهد کاهش داد (سافاری و همکاران ۲۰۱۲). فرآوری زیستی مغز میوه‌ی بلوط با باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم منجر به کاهش غلظت فنل کل، فنل غیرتانني، تانن کل، تانن متراکم و تانن قابل هیدرولیز شد (بهاءالدینی و همکاران ۲۰۱۸). در تحقیقی که با هدف بررسی اثر ریزوپوس الیگوسپروس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ساکارومایسس سرویسیه بر تجزیه تانن و اسید فیتیک آرد سورگوم انجام شد، غلظت تانن و اسید فیتیک آرد سورگوم بوسیله آنزیم‌های تاناز و فیتاز تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها کاهش یافت (ستی‌روتو و وجیست‌چیتی ۲۰۱٦) که تایید کننده‌ی تاثیر تاناز تولید شده توسط باکتری‌های تجزیه کننده‌ی

تانن بر تجزه‌ی تانن برگ اکالیپتوس در آزمایش حاضر است.

Table 2- Chemical composition of eucalyptus leaves treated with tannin-degrading bacteria

Variables (%)	treatment					SEM	P-Value
		Bacteria used for treating					
	Control	*Klebsiella pneumoniae*	*Acinetobacter*	*Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
Dry matter	69.50	71.40	71.30	70.00	70.50	0.866	0.510
Crude protein	8.81	7.19	7.61	8.67	7.66	0.479	0.221
NDF	61.69	61.50	61.60	61.67	61.66	0.462	0.922
ADF	48.73	48	48.66	48.64	48.63	0.463	0.701
Tannin	6.59[a]	4.16[b]	4.22[b]	4.69[b]	4.50[b]	0.730	0.042

Control: untreated eucalyptus leaves, Tannin-degrading bacteria including *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.
[a,b] Means with different superscripts in the same row differ significantly (P< 0.05).
SEM= standard error of means;

پتانسیل و نرخ تولید گاز برگ اکالیپتوس

اثر تیمارهای آزمایشی بر پتانسیل و نرخ تولید گاز برگ اکالیپتوس و جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس (جدول ۳) معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در مورد برگ اکالیپتوس، غیر از تیمار *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* تجاری که به‌طور عددی بیشتر از شاهد بود، اختلاف سایر تیمارها با شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)؛ بیشترین پتانسیل تولید گاز مربوط به *لاکتوبا سیلوس فرمنتوم* جدا شده و با اختلاف جزئی *کلبسیلا پنومونیه* بود. استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده تانن باعث افزایش معنی‌دار پتانسیل تولید گاز جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس نسبت به شاهد شد (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار پتانسیل تولید گاز جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس مربوط به عمل‌آوری با *کلبسیلاپنومونیه* بود که اختلاف آن با شاهد و سایر تیمارهای حاوی باکتری به استثناء *اسینتو باکتر* معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). اثر تیمارهای آزمایشی بر نرخ تولید گاز برگ اکالیپتوس و جیره‌های حاوی برگ آن معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). بیشترین نرخ تولید گاز در برگ اکالیپتوس عمل آوری با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده و کمترین در برگ عمل آوری شده با *اسینتو باکتر* بود. اما در جیره های حاوی برگ اکالیپتوس بیشترین مقدار نرخ تولید گاز در حین عمل آوری شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* تجاری بود.

احتمالا دلیل کم‌تر بودن پتانسیل تولید گاز در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای عمل‌آوری شده با باکتری، مقدار تانن بیشتر در تیمار بدون عمل آوری است (جدول ۲)، زیرا تانن‌ها و مواد فنلی با تشکیل پیوند و کمپلکس با مواد مغذی مانند کربوهیدرات، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، غشای سلولی باکتری، آنزیم‌های هضم کننده پروتئین و کربوهیدرات باعث کاهش دسترسی میکروارگانیسم‌های شکمبه به آن‌ها و در نتیجه کاهش تجزیه آن‌ها می‌شود (پاترا و ساکسنا ۲۰۱۰)؛ به عبارت دیگر، علت بیشتر شدن پتانسیل تولید گاز در هنگام استفاده از باکتی‌های تولید کننده تاناز، کاهش تانن و در نتیجه مهار اثرات منفی تانن موجود در برگ اکالیپتوس است.

نتایج نشان داد که تانن‌زدایی اسپرس آبی با آب و اوره باعث افزایش پتانسیل تولیدگاز و نرخ تولید گاز نسبت به اسپرس آبی بدون عمل‌آوری شد (یاراحمدی و همکاران ۲۰۱۷). در واقع افزایش تولید گاز در تیمارهای عمل آوری شده نشان دهنده تاثیر باکتری‌های تولید کننده‌ی تاناز در کاهش مقدار تانن در برگ اکالیپتوس است. تانن دانه انگور و شاه بلوط باعث کاهش تولید گاز شد (پلیکان

و همکاران ۲۰۱۱). در مطالعه آزمایشگاهی تاثیر تانن متراکم گیاه لوسنا بر تولید متان و جمعیت پروتوزوا، نشان داد که افزودن تانن متراکم باعث کاهش کل گاز تولیدی شد (تان و همکاران ۲۰۱۱)، که این نتایج تایید کننده‌ی اثر کاهشی تانن‌ها بر تولید گاز است.

Table 3- Potential and rate of gas production of eucalyptus leaves and diets containing eucalyptus leaves treated with tannin-degrading bacteria

Variables	treatment					SEM	P-Value
	Control	Bacteria used for treating					
		Klebsiella pneumoniae	*Acinetobacter*	*Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
Eucalyptus leaves							
Gas production potential (ml)	64.81[b]	85.06[a]	81.00[a]	85.52[a]	68.85[b]	6.01	0.029
Gas production rate (ml/h)	0.02[b]	0.030[b]	0.02[b]	0.05[a]	0.035[ab]	0.005	0.030
Diets containing eucalyptus leaves							
Gas production potential (ml)	77.48[c]	109.39[a]	99.28[ab]	90.05[b]	87.90[b]	5.11	0.002
Gas production rate (ml/h)	0.08[ab]	0.05[b]	0.056[b]	0.07[ab]	0.10[a]	0.012	0.047

Control: untreated eucalyptus leaves, Tannin-degrading bacteria including *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.
[a,b] Means with different superscripts in the same row differ significantly (P< 0.05).
SEM= standard error of means

فراسنجه‌های تخمیری گاز برگ اکالیپتوس

نتایج فراسنجه های تخمیری گاز برگ اکالیپتوس و جیره های حاوی برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با باکتری‌های تجزیه کننده تانن در جدول ٤ نشان داده شد که اثر تیمارها بر ماده‌ی آلی واقعا تجزیه شده و تولید توده‌ی زنده میکروبی برگ اکالیپتوس و جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). اثر استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده تانن در عمل آوری برگ اکالیپتوس بر مقدار ماده آلی واقعا تجزیه شده معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) و بیشترین مقدار در برگ اکالیپتوس عمل آوری شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده و با اختلاف کمی مربوط به *کلبسیلا پنومونیه* بود (P<۰/۰۵)؛ اختلاف بین تیمار های عمل‌آوری شده با باکتری با یکدیگر تنها عددی بود. در جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس بیشترین مقدار مقدار ماده آلی واقعا تجزیه شده در تیمار *کلبسیلا پنومونیه* مشاهده شد. سایر فراسنجه‌ها در برگ و جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. علت بهبود معنی‌دار یا عددی فراسنجه‌های تولید گاز را می‌توان به نقش باکتری های تولیدکننده تاناز مورد استفاده، در تجزیه‌ی تانن برگ اکالیپتوس دانست؛ در پژوهشی عمل آوری کردن اسپرس آبی و دیم (منابع غنی از تانن) با آب و اوره، بر فرا سنجه‌های تولیدگاز و خصوصیات تخمیر برون تنی بررسی شد؛ نتایج نشان داد که تانن‌زدایی اسپرس آبی با آب و اوره باعث افزایش میزان ماده آلی واقعا تجزیه شده شد (یاراحمدی و همکاران ۲۰۱۷) که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد. در واقع اثر مهار کنندگی تانن در تیمارهای بدون عمل‌آوری باعث کاهش اتصال میکربی ذرات خوراک، کاهش رشد میکربی و کاهش فعالیت آنزیم‌های میکربی می‌شود؛ در واقع تانن‌ها با مهار فعالیت میکروارگانیسم‌ها و یا آنزیم‌های میکربی، تخمیر شکمبه‌ای را کاهش می‌دهند (گوئل و ماکار ۲۰۱۲). عمل‌آوری سیلاژ محصولات فرعی پسته با پلی اتیلن گلایکول تولید گاز، انرژی قابل متابولیسم و قابلیت

هضم ماده آلی را در مقایسه با سیلاژ بدون عمل آوری افـــزایش داد (گتاچیو و همکاران ۲۰۰۸)؛ این شواهد اثر مثبت تانن‌زدایی را نشان می‌دهد. بنابراین افزایش هر چند عددی ماده واقعا تجزیه شده یا هضم شده، بازده میکربی و PF در بعضـــی از تیمارها نشـــان دهنده‌ی تاثیر باکتری تولید کننده‌ی تاناز در آزمایش حاضر است.

Table 4- Fermentative parameters of gas production of eucalyptus leaves and diets containing eucalyptus leaves treated with tannin-degrading bacteria

Variables	treatment					SEM	P-Value
	Control	Bacteria used for treating					
		Klebsiella pneumoniae	*Acinetobacter*	*Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
Eucalyptus leaves							
TOMD (mg)	158.65[b]	188.30[a]	178.72[a]	188.62[a]	176.97[a]	5.23	0.002
PF (mg/ml)	4.90	4.43	4.41	4.41	5.14	0.44	0.092
MB (mg)	87.48[c]	94.84[ab]	89.51[bc]	94.50[ab]	101.19[a]	4.98	0.037
MBE (%)	55.14	50.37	50.10	50.10	57.18	3.97	0.349
Diets containing eucalyptus leaves							
TOMD (mg)	162.20[c]	199.40[a]	187.35[a]	189.10[a]	181.45[a]	6.35	0.047
PF (mg/ml)	4.19	3.65	3.78	4.20	4.13	0.301	0.300
MB (mg)	77.01[b]	79.31[b]	78.43[b]	90.05[a]	84.82[ab]	4.04	0.043
MBE (%)	47.48	39.77	41.86	47.62	46.74	4.41	0.290

Control: untreated eucalyptus leaves, Tannin-degrading bacteria including *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.
TOMD: truly organic matter degradability; PF: partitioning factor; MB: microbial biomass; MBE: microbial biomass efficiency
[a,b] Means with different superscripts in the same row differ significantly (P< 0.05).
SEM= standard error of means

قابلیت هضم آزمایشگاهی برگ اکالیپتوس

اثر باکتری‌های تجزیه کننده‌ی تانن بر قابلیت هضم آزمایشگاهی برگ اکالیپتوس و جیره‌های حاوی برگ آن معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) که در جدول ۵ نشان داده شده است. در مقایسه با تیمار شاهد، عمل‌آوری با باکتری‌های تجزیه کننده‌ی تانن منجر به افزایش معنی‌دار قابلیت هضم مواد مغذی شامل ماده‌ی خشک، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی شد. در مورد قابلیت هضم ADF، اختلاف بین تیمارهای حاوی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جدا شده با یکدیگر فقط به‌صورت عددی بود، اما اختلاف این دو تیمار با تیمارهای حاوی *اسینتو باکتر* و *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* تجاری معنی‌دار بود؛ البته، برای قابلیت هضم ماه خشک و NDF اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. بیشترین درصد قابلیت هضم ماده خشک، NDF و ADF در برگ اکالیپتوس مربوط به باکتری *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جدا شده از بز و کمترین در شاهد بود (P< ۰/۰۵). در جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس، بیشترین درصد قابلیت هضم ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی مربوط به تیمار عمل‌آوری شده با *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جدا شده از بز بود (P< ۰/۰۵). از نظر قابلیت هضم ماده خشک و ADF، بین تیمارهای عمل‌آوری شده با یکدیگر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما قابلیت هضم NDF در تیمار *لاکتو باسیلوس فرمنتوم* جدا شده از بز و باکتری *کلبسیلا پنومونیه* از دو باکتری دیگر بیشتر بود (P<۰/۰۵).

قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، NDF و ADF در بره‌های پرواری تغذیه شده با پوست انار کاهش یافته است که دلیل آن حضور تانن در ماده

خشک مصرفی بیان شده است (عزیزنیا و همکاران ۲۰۱٤). قابلیت هضم دیواره سلولی یونجه در حضور سطوح مختلف برگ اکالیپتوس کاهش یافت که حضور تانن و ساپونین موجود در برگ اکالیپتوس عامل آن شناخته شد (ش و همکاران ۲۰۱۸). در این راستا، وارد نمودن کشت *خالص استرپتوکوکوس کاپرینوس* (تجزیه کننده تانن) به شکمبه گوسفند باعث افزایش هضم و جذب نیتروژن و مصرف ماده خشک شد (بروکر و همکاران ۱۹۹٤). همچنین افزایش قابلیت هضم دیواره سلولی در نتیجه عمل‌آوری با باکتری‌های تجزیه کننده تانن در شرایط آزمایشگاهی نیز گزارش شد (محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۱). تانن‌ها مانع هضم الیاف و پروتئین هستند، بنابراین کاهش سطح تانن توسط جدایه‌ها، فعالیت آنزیم‌های پروتئولتیک را افزایش داده و با رهاسازی مواد مغذی از اتصال با تانن، باعث بهبود قابلیت هضم مواد غذایی شده است (گوئل و همکاران ۲۰۰۵).

Table 5- *in vitro* digestibility of eucalyptus leaves and diets containing eucalyptus leaves treated with tannin-degrading bacteria

Variables (%)	treatment					SEM	P-Value
	Control	Bacteria used for treating					
		Klebsiella pneumoniae	*Acinetobacter*	*Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
Eucalyptus leaves							
Dry matter	65.34[b]	69.36[a]	69.97[a]	68.96[a]	67.87[a]	1.05	0.02
NDF	49.55[b]	55.55[a]	54.64[a]	58.42[a]	56.81[a]	1.41	0.007
ADF	44.53[c]	51.50[a]	48.37[b]	51.57[a]	47.69[b]	1.43	0.01
Diets containing eucalyptus leaves							
Dry matter	69.28[b]	72.55[a]	72.23[a]	74.70[a]	73.13[a]	2.23	0.007
NDF	59.88[c]	64.79[ab]	63.36[b]	66.82[a]	62.76[b]	1.14	0.04
ADF	53.65[c]	60.19[ab]	58.63[b]	61.84[a]	58.01[b]	1.44	0.002

Control: untreated eucalyptus leaves, Tannin-degrading bacteriincludingde *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* isolated from deer rumen, *Lactobacillus fermentum* isolated from Najdi goat rumen, and Commercial *Lactobacillus fermentum*.
NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber
[a,b] Means with different superscripts in the same row differ significantly (P< 0.05).
SEM= standard error of means

غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH و جمعیت پروتوزآ

اثر عمل‌آوری برگ اکالیپتوس با باکتری‌های تجزیه کننده تانن بر غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH مایع شکمبه و جمعیت پروتوزآی برگ و جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس معنی‌دار بود(P<۰/۰۵) (جدول ٦). کمترین غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH و جمعیت پروتوزوآی برگ و جیره‌های حاوی برگ در گروه شاهد مشاهده شد. در مورد برگ اکالیپتوس، بیشترین غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمار حاوی *کلبسیلا پنومونیه* مشاهده شد. بعلاوه، در جیره‌های حاوی برگ اکالیپتوس بیشترین جمعیت پروتوزوآ نیز در همین تیمار مشاهده شد.

تانن‌ها با اتصال به پروتئین و کاهش نرخ تجزیه پذیری پروتئین، سبب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی می‌شوند (بن سالم و همکاران ۲۰۰۵; اسلیوینسکی و همکاران ۲۰۰۲). تلقیح باکتری *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس کاپرینوس* استخراج شده از مایع شکمبه بزهای فرال به عنوان باکتری‌های تجزیه کننده تانن، به گوسفندان تغذیه شده با آکاسیا (حاوی تانن)، سبب بهبود قابلیت هضم پروتئین شد (مین و همکاران ۲۰۰۵). همچنین، تلقیح شکمبه‌ای باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت مقاوم به تانن به گوسفندان تغذیه شده با پوست بادام زمینی حاوی ۷/۱ درصد تانن متراکم، اثر مطلوبی بر هضم پروتئین، کاهش دفع نیتروژن و تعادل نیتروژن نسبت به تیمار شاهد داشت (مولینا و همکاران ۱۹۹۹). که افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی در آزمایش حاضر که به مفهوم افزایش تجزیه‌ی پروتئین در اثر

تجزیه‌ی تانن است با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد.

تانن‌ها باعث کاهش pH شکمبه می‌شوند (مین و همکاران ۲۰۰۵) که یکی از دلایل آن را تغییر در الگوی باکتری‌های شکمبه به ویژه باکتری‌های تجزیه کننده‌ی سلولز بیان کردند که در این شرایط جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه کاهش می یابد (خوافی پور و همکاران ۲۰۰۹) در واقع تولید اسیدهای چرب فرار در اثر تجزیه ترکیبات فنولی می‌تواند pH شکمبه را کاهش دهد (ساحا و گوش ۲۰۱۹). که افزایش pH در تیمارهای حاوی باکتری تانن زدا در آزمایش حاضر تایید کننده‌ی این موضوع است. در آزمایشی مصرف بلوط (حاوی تانن) باعث کاهش pH شکمبه بز الموت شد (مالدار و همکاران ۲۰۱۰). همچنین عمل‌آوری چای سبز با باکتری های تجزیه کننده تانن تاثیری بر میزان pH شکمبه‌ای نداشت (کوندو و همکاران ۲۰۰٤). افزودن مکمل پلی اتیلن گلیکول به عنوان یک باند کننده‌ی تانن سبب افزایش جمعیت پروتوزوآ شد و گوسفندان از نظر افزایش تعداد پروتوزوآ نسبت به بزها پاسخ بهتری نشان دادند (یانس روئیس و همکاران ۲۰۰٤). کاهش پروتوزوا شکمبه با مصرف جیره‌های حاوی اسپرس آبی و دیم (حاوی تانن) و سپس افزایش آن بعد از عمل اوری گزارش شد (یاراحمدی و همکاران ۲۰۱۷). کاهش جمعیت پروتوزوآ در تیمار شاهد و افزایش آن در حین عمل‌آوری با باکتری‌های تانن‌زدا، احتمالا به دلیل ساختار پلی فنولی موجود در این مواد خوراکی می‌باشد؛ چون این ساختارها منجر به پاره شدن غشا سلول پروتوزوآ، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و کاهش سوبسترا و یون‌های فلزی مورد نیاز برای متابولیسم سلولی می‌باشند (گوئل و همکاران ۲۰۰۵). که نتایج آزمایش حاضر تایید کننده‌ی این موضوع است.

Table 6- Effect treating of eucalyptus leaves with tannin-degradatig bacteria on concentration of ammonia nitrogen, ruminal pH and protozoa population (×10^4) in gas production experiment

Variables	treatmen					SEM	P-Value
	Control	Bacteria used for treating					
		Klebsiella pneumoniae	*Acinetobacter*	*Lactbacillus fermentum* (Isolated)	*Lactbacillus fermentum* (Commercial)		
Eucalyptus leaves							
NH3-N (mg/dl)	18.12^{d}	33.73^{a}	18.28^{dc}	27.53^{ab}	21.98^{bc}	2.24	0.0001
pH	6.40^{c}	6.53^{b}	6.61^{a}	6.55^{b}	6.60^{a}	0.006	0.0001
Total protozoa	9.00^{c}	11.00^{b}	12.50^{a}	10.00^{bc}	9.50^{c}	0.316	0.001
Diets containing eucalyptus leaves							
NH3-N (mg/dl)	17.22^{c}	28.54^{a}	21.66^{b}	17.42^{c}	23.33^{b}	0.483	0.0001
pH	6.2^{d}	6.4^{c}	6.7^{a}	6.54^{b}	6.51^{b}	0.010	0.0001
Total protozoa	9.00^{b}	13.50^{a}	9.50^{b}	9.08^{b}	12.50^{a}	0.591	0.02

SEM= standard error of means; Tannin-degrading bacteria including *Klebsiella pneumoniae* and Acinetobacter isolated from deer rumen, Lactobacillus fermentum isolated from Najdi goat rumen, and Commercial Lactobacillus fermentum.
[1]OMD: organic matter digestibility; [2]PF: partitioning factor; [3]MB: microbial biomass; [4]EMB: efficiency of microbial biomass.
[a,b,c] Means with different superscripts in the same row differ significantly (P< 0.05).

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که استفاده از باکتری‌های تولید کننده‌ی تاناز باعث تجزیه‌ی تانن شد و کیفیت گیاه دارای تانن را

بهبود بخشید، بنابراین استفاده از آنها می‌تواند راهکار مناسبی برای کاهش تانن و بهبود ارزش غذایی آن برای دام شود. اگر چه، توصیه می‌شود که در دام‌های مختلفی که از مواد تانن‌دار تغذیه می‌کنند به صورت تغذیه مستقیم استفاده شود و نتایج در سطح مزرعه‌ای نیز بررسی شود؛ یا این‌که نظیر آزمایش حاضر، ابتدا گیاهان تانن‌دار با این باکتری‌ها عمل‌آوری شوند و بعد در تغذیه دام‌ها مورد استفاد قرار گیرند. در آزمایش حاضر اگرچه *کلبسیلا پنومونیه* و *لاکتوبا سیلوس فرمنتوم* جدا شده از شکمبه گوزن بهترین اثر را در تانن زدایی و بهبود هضم و تخمیر داشتند با این حال، با توجه به نتایج نزدیک باکتری‌های استفاده شده در آزمایش حاضر انتخاب نوع باکتری برای استفاده در دامداری‌ها بسته به شرایطی نظیر فراهمی، دسترسی به امکانات برای تکثیر و آماده سازی و یا تجاری سازی در قالب محصولاتی که استفاده از آنها آسان‌تر باشد؛ خواهد بود.

منابع مورد استفاده

AOAC. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 19th ed, 2012. Gaithersburg.

Asghari J and Mazaheritehrani M, 2010. Extraction of tannin from Eucalyptus camaldulensis Dehnh, and trimyristin from Myristica fragrans Houtt. by using microwave irradiation. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research 26(2): 185-195.

Assareh MH, Sedaghati M, Kiarostami K and Zare AG, 2010. Seasonal changes of essential oil composition of Eucalyptus maculata Hook. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research 25(4): 581-588.

Aziznia y, Sari M, Mohammadabadi T, Bojarpor M and Salari S, 2014. The effect of adding methionine to diets containing tannins on growth performance and nutrient digestibility of male Arabian lambs. MSc thesis, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, 87-89.

Babadi L, Chaji M and MohammadAbadi T, 2018. The effect of feeding whole branch of Albizia lebbeck tree on digestibility, some fermentation characteristics and rumen protozoa population of Najdi goats. Journal of Animal Science Researches 28(1): 195-211.

Bahaaldini R, Khajavi M, Naghiha R and Prsaei S, 2018. Bioprocessing of acorn kernel with Lactobacillus plantarum to reduce its tannin. Journal of Animal Science Research 28(2): 1-10.

Ben Salem H, Abidi S, Makkar H and Nefzaoui A, 2005. Wood ash treatment, a cost-effective way to deactivate tannins in Acacia cyanophylla Lindl. foliage and to improve digestion by Barbarine sheep. Animal Feed Science and Technology 122: 93-108.

Blummel M, Steinggaβ H and Becker K, 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for prediction of voluntary feed intake of roughages. British Journal of Nutrition 77: 911-921.

Broderick GA and Kang JH, 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. Journal of Dairy Science 63: 64-75.

Brooker JD, O'Donovan LA, Skene I, Clarke K, Blackall L and Muslera P, 1994. Streptococcus caprinus sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. Letters in Applied Microbiology 18: 313–3

Brooker MIH and Kleinig DA, 2006. Field Guide to Eucalyptus. Vol.1. South-eastern Australia, Third edition. Bloomings, Melbourne, Australia 49(5): 1051-1057.

Chaji M, Direkvandi E and Salem AZM, 2020. Ensiling of Conocarpus erectus tree leaves with molasses, exogenous enzyme and *Lactobacillus plantarum* impacts on ruminal sheep biogases production and fermentation. Agroforestry Systems 94: 1611–1623.

Dehority BA, 2003. Rumen microbiology. Nottingham, Nottingham University Press, 372.

Dubey M, Dutta N, Sharma K, Pattanaik AK, Banerjee PS and Singh M, 2011. Effect of condensed tannins supplementation from tanniferous tree leaves on *in vitro* nitrogen and substrate degradation. Animal Nutrition and Feed Technology 11(1): 115-122.

Getachew G, Pittroff W, DePeters EJ, Putnam DH, Dandekar A and Goyal S, 2008. Influence of tannic acid application on alfalfa hay: *in vitro* rumen fermentation, serum metabolites and nitrogen balance in sheep. Animal 2(3): 381-390.

Goel G and Makkar HP, 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. Tropical Animal Health and Production 44(4): 729-739.

Goel G, Puniya A, Aguilar C and Singh K, 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. Naturwissenschaften 92: 497-503.

Hiura T, Hashidoko Y, Kobayashi Y and Tahara S, 2010. Effective degradation of tannic acid by immobilized rumen microbes of a sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in winter. Animal Feed Science and Technology, 155(1): 1-8.

Huang Q, Liu X, Zhao G, Hu T and Wang Y, 2018. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. Animal Nutrition 4: 137-150.

Khafipour E, Krause DO and Plaizier JC, 2009. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. Journal of Dairy Science 92: 1712–1724.

Kondo M, Kita K and Yokota HO, 2004. Feeding value to goats of whole crop oat ensiled with green tea waste. Animal Feed Science and Technology 113: 71-81.

Kumar M, Beniwal V and Salar RK, 2015. Purification and characterization of a thermophilic tannase from Klebsiella pneumoniae KP715242. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 4 (4): 745-751.

Lim YY and Murtijaya J, 2007. Antioxidant properties of Phyllanthus amarus extracts as affected by differen drying methods. LWT-Food Science and Technology 40 (9): 1664-1669.

Maldar SM, Roozbehan Y and Alipour D, 2010. The effect of adaptation to oak leaves on digestibility (*in vitro*) and ruminal parameters in Alamout goat. Iranian Journal of Animal Science 41(3): 243-252.

Macphail M and Thornhill AH, 2016. How old are the eucalypts? A review of the microfossil and phylogenetic evidence. Australian Journal of Botany 64: 579-599. doi*:*10.1071/BT16124.

Menke KH and Steingass H, 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Animal Research Development. 28: 7–55.

Min BR, Pinchak WE, Fulford JD, Puchala R, 2005. Wheat pasture bloat dynamics, *in vitro* ruminal gas production, and potential bloat mitigation with condensed tannins. Journal of Animal Science 83(6): 1322-1331.

Mohammadabadi T, Gheibipour M, Motamedi H, Chaji M and Abbas BA, 2021. Isolation and identification of tannin-degrading bacteria from deer gut and potency for improving nutritional value of tannin rich plants. Iranian Veterinary Journal 17(1): 65-75*.*

Mohammadabadi T, Jolazadeh A and Ghezi Z, 2020. Effect of treated Conocarpus erectus L. leaves with Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter as tannin-degrading bacteria on digestion activity of rumen microorganisms. Biotechnology in Animal Husbandry 36(1): 1-16.

Molina DO, Pell AN and Hogue DE, 1999. Effects of ruminal inoculations with tannin tolerant bacteria on fibre and nitrogen digestibility of lambs fed a high condensed tannic diet. Animal Feed Science and Technology 81: 69-80.

Norouzi J, Khanafari A and Biglari N, 2008. Isolation and identification of lactic acid bacteria in their mouths and inhibitory effects on some pathogenic intestinal bacteria. World Journal of Microbiology 1: 29-38.

NRC, 2007. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids. National Academy Press Washington DC.

Orskov ER and McDonald I, 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal of Food Engineering 80: 1-10.

Patra AK and Saxena J, 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry 71(11-12): 1198-1222.

Pellikaan WF, Stringano E, Leenaars J, Bongers DJ, van Laar-van Schuppen S, Plant J, and Mueller-Harvey I, 2011. Evaluating effects of tannins on extent and rate of *in vitro* gas and CH4 production using an automated pressure evaluation system (APES). Animal Feed Science and Technology 166: 377-390.

Powell MC, Muntifering RB, Lin JC and Chappelka AH, 2003. Yield and nutritive quality of sericealespedeza (Lespedeza cuneata) and little bluestem (Schizachyrium scoparium) exposed to ground level ozone. Environmental Pollution 122(3): 313-322.

Rahmani H, Farzad Mirzaei A, Navidshad B, Nikbin S and Moradzadeh-Somarin Z, 2019. A review on the eucalyptus herb and its effect on livestock and poultry nutrition. The Second International Conference and the Sixth National Conference on Agriculture 12(5): 81-89.

Safari O, Farhangi M, Yakhchali B and Mehraban-Sang-Atash M, 2012. The effect of fermentation process with *Lactobacillus plantarum* on reducing the anti-nutritional compounds of canola protein concentrate. The Third National Conference on Agricultural Biotechnology in Iran, 1-5.

Saha SS and Ghosh M, 2019. Comparative study of antioxidant activity of [alpha]-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. Food and Chemical Toxicology 47(10): 2551-2556.

Setiarto RHB and Widhyastuti N, 2016. Pengaruh fermentasi bakteri asam laktat terhadap sifat fisikokimia teung gadung modifikasi (Dioscorea hispida) Effect of lactic acid bacteria fermentation for physicochemical prperties of modified yam flour (Dioscorea hispida). Jurnal Litbang Industri 6(1): 61-72.

Sh A, 2015. Effect of Yarrow flower (*Achillea millefolium*) and Eucalyptus leaf (Eucalyptus globolus) on *in vitro* digestibility of alfalfa hay. Journal of Animal Science Research 25(3): 73-83.

Sliwinski BJ, Soliva CR, Machmüller A, and Kreuzer M, 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. Animal Feed Science Technology 101(1-4): 101–114.

Tan HY, Sieo CC, Abdullah N, Liang JB, Huang XD and Ho YW, 2011. Effects of condensed tannins from Leucaena on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. Animal Feed Science and Technology 169(3-4): 185-193.

Tilley JMA and Terry RA 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. Grass and Forage Science 18(2): 104-111.

Van Soest PJ, Roberson JB and Lewis BA, 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science 74(10): 3583-3597.

Yanes Ruis DR, Moumen A, Martin Garica AI and Molina Alcaide E, 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two stage olive cake: Effact of PEG supply. Journal of Animal Science 82(7): 2023-2032.

Yarahmadi B, Chaji M, Boujarpour M, Mirzadeh K and Rezaei M, 2017. Effects of sainfoin tannin treated by water or urea on microbial population, gas production parameters, digestibility and *in vitro* fermentation. Iranian Veterinary Journal 13(3): 97-114.

Use of some tannin-producing bacteria to reduce tannins and improve the nutritional value of Eucalyptus *(Eucalyptus camaldulensis)* leaves

Zahra Jahanara[1], Morteza Chaji[2*] and Omid Khorasani[3]

Received: June 15, 2022 Accepted: October 29, 2023

[1] Graduate student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran
[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran
[3]PhD of Animal Nutrition, Kharazmi Industrial School of Dezful, Dezful, Iran
[*] Corresponding author: E mail: chaji@asnrukh.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research

Journal of Animal Science/vol.33 No.3/ 2023/pp 83-98
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/AS.2023.52119.1667

Introduction: Eucalyptus leaves contain tannins and flavonoids (Asghari and Mazaheriani 2010). Tannins have beneficial and harmful effects depending on their concentration, animal physiological condition and diet composition (Dubai et al. 2011). By increasing the amount of tannins, the digestibility of proteins decreases and prevents the digestion of lignocellulosic materials that are dependent on extracellular enzymes (Babadi et al. 2018). In addition to the anti-nutritional effects of tannins at high concentrations, the positive effects of dense tannins at optimal concentrations include improved live weight gain, increased milk production, reduced NH3-N and methane production in the rumen (Lim and Mortijaya 2007). Using methods that can reduce the amount of tannins, make tannins plants used more and more effectively in animal nutrition (Huang et al. 2018). In addition to chemical methods and other methods for de-tannins, there are also biological methods (Chaji et al. 2020; Mohammadabadi et al. 2020). The enzyme tanase, which leads to the breakdown of tannins, has wide applications in the food and chemical industries. In addition, tanase is used in the production of animal feed (Chavez-Gonzalez et al. 2012). Bacterial tanase can effectively break down and hydrolyze natural tannins and tannic acid (Kumar et al. 2015). Bacterial tanase can effectively break down and hydrolyze natural tannins and tannic acid (Kumar et al. 2015). *Klebsiella pneumoniae* and Acinetobacter, as tannin degraders isolated from deer rumen, improved the fermentation parameters of eucalyptus leaves, so the use of these isolates will be useful to improve the nutritional value of tannin-containing plants (Mohammadabadi et al. 2021). Japanese rats with the bacterium Lactobacillus, which produces tannins; Was able to adapt to tannin-rich foods (Sasaki et al. 2005). Therefore, in tropical and subtropical regions, the processing of tannin-rich trees with tanase is very important in animal nutrition systems (Mohammadabadi et al. 2020). Therefore, the current research was conducted to use tannase-producing bacteria to improve the nutritional value of eucalyptus leaves.

materials and methods: The tannin-degrading bacteria used in the present experiment were isolated from the rumen of deer and goat Najdi, and their ability to produce tanase and de-tannins them has already been investigated in experiments (Chaji et al. 2020; Mohammadabadi et al. 2020; Mohammadabadi et al. 2021). The tannin degrading bacteria used in the present experiment included Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter isolated from deer rumen, Lactobacillus fermentum isolated from Najdi goat rumen and commercial Lactobacillus fermentum. For processing, eucalyptus

leaves, after turning them into 3-4 cm pieces, were tested in 10 liters of distilled water containing 1 liter of Nutrient Broth solution containing bacteria (10^7 cfu / ml) and to anaerobize the environment, immediately were transferred in10 kg plastic bags, and were closed and kept at 37 ° C for 10 days. After leaving the bags, they were dried, ground and mixed with rations, were given to lambs (Mohammadabadi et al. 2021). Experimental treatments include 1- Eucalyptus leaves or diets containing it without processing (control), treatment 2-5- Eucalyptus leaves or diets containing it that were treated with any of the four tannin-degrading bacteria. Then, the nutritional value of eucalyptus leaves alone or in combination with diet of fattening lamb, was studied by two-step digestion and gas production experiments.

Results and discussion: The effect of experimental treatments on gas production potential, gas production rate, truly degraded organic matter, and production of microbial biomass of eucalyptus leaves and diets containing it was significant (P <0.05). The gas production potential of all experimental treatments was higher than the control (P <0.05). The digestibility of DM, NDF and ADF of eucalyptus leaves, and diets containing it in all treatments was significantly higher than the control treatment (P <0.05). The effect of experimental treatments on NH3 concentration, pH, and protozoan population of ruminal fluid of eucalyptus leaves and diets containing leaves was significant (P <0.05). Increased gas production in the treated treatments and the reason for significant improvement or numerical of gas production parameters can be attributed to the role of tanase-producing bacteria used in the decomposition of eucalyptus leaf tannin (Yarahmadi et al. 2017). In fact, tannins reduce ruminal fermentation by inhibiting the activity of microorganisms or microbial enzymes (Goel and McCarthy 2012). Increase though numerically of actually decomposed or digested material, microbial efficiency and PF in some treatments indicate the effect of tanase-producing bacteria in the present experiment (Gatacho et al. 2008). Tannins inhibit the digestion of fibers and proteins, so reducing the level of tannins by isolates, increases the activity of proteolytic enzymes and improves the digestibility of feed by releasing nutrients from the tannin binding (Goel et al. 2005). Tannins also reduce the concentration of NH3 by binding to proteins and reducing the rate of protein degradability (Ben Salem et al. 2005). The decrease in protozoan population in the control treatment and its increase during treatment with tanase-causing bacteria is probably due to the polyphenolic structure of these foods (Goel et al. 2005).

Conclusion: The results of this experiment showed that the use of tanase-producing bacteria degraded leaf tannins and improved its quality, so their use can be a good way to reduce tannins and improve the nutritional value of eucalyptus leaves for livestock.

Keywords: Ammonia nitrogen, Digestibility, Gas production, Microbial biomass production efficiency, Protozoa, Tannins