نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۷ شماره ۱/ سال۱۳۹۶/ صفحات ۲۰۵ تا ۲۱۶

طراحی، ساخت و ارزیابی سامانه اتوماتیک اندازه‌گیری تولید گاز برای تعیین کینتیک تخمیر میکروبی مواد خوراکی

احمد ریاسی[1*]، فرهاد احمدی[2]، حمید رضا معین الدینی[3]، سید محمد هادی راهوی[4] و حمید خشوعی[5]

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۵

[1] دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
[2] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه شیراز
[3] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
[4] دانش آموخته کارشناسی ارشد مکاترونیک دانشگاه آزاد اسلامی خمینی شهر
[5] کارشناس آزمایشگاه تغذیه دام گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
[*]مسول مکاتبه: Email: ariasi@cc.iut.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: اندازه‌گیری گاز تولیدی به روش دستی در تکنیک اندازه‌گیری تولید گاز طاقت فرسا، نیازمند نیروی انسانی زیاد، و تکرار پذیری کمی دارد، که نیاز به استفاده از سیستم‌های اتوماتیک اندازه گیری تولید گاز را ضروری می‌نماید. **هدف:** اهداف این مطالعه شامل ساخت و تایید صحت کارکرد یک سامانه کاملا اتوماتیک اندازه‌گیری تولید گاز برای تسهیل مطالعات کینتیک تخمیر میکروبی بودند. **روش‌کار:** سه نمونه خوراک شامل کنجاله سویا، یونجه خشک و کنسانتره گاوه شیرده به همراه ٦٠ میلی‌لیترمایع شکمبه داخل ویال‌های کالیبره شده ریخته شد. در سامانه اتوماتیک، فشار گاز از فضای بالای هر بطری با کمک رابط استیل با شیلنگ مخصوص کاملا نفوذ ناپذیر به دی اکسید کربن به سنسور فشار انتقال داده شد. در سامانه اتوماتیک، داده‌های فشار گاز هر ۳۰ دقیقه یک‌بار در بازه ۷۲ ساعته انکوباسیون در نرم افزار اکسل ثبت شدند. فشار گاز تجمع یافته در ویال‌ها بلافاصله پس از ثبت فشار بطور اتوماتیک توسط شیر برقی تخلیه شد. به منظور تایید صحت کارکرد سامانه اتوماتیک، بطور همزمان و در آزمایشی دیگر حجم گاز بر اساس جابه‌جا شدن سطح آب در ستون شیشه ای در زمان‌های ۲، ٤، ٦، ٨، ١٢، ١٦، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت نیز اندازه‌گیری و نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از سامانه اتوماتیک مقایسه شدند. **نتایج:** ضریب همبستگی پیرسون برای داده‌های حجم تجمعی گاز در زمان های ٦، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از شروع تخمیر و همچنین پتانسیل تولید گاز بین دو روش اندازه‌گیری اتوماتیک و دستی بیش از ۹۰ درصد بود ($P<۰/۰۰۱$) که صحت کارکرد سامانه اتوماتیک را تایید می‌کند. **نتیجه‌گیری نهایی:** در مقایسه با روش اندازه‌گیری دستی، سیستم کاملا اتوماتیک جدید با دقت بالا و در عین حال زحمت کمتر و بدون خطاهای فردی فشار گازی تولید حاصل از تخمیر میکروبی را تعیین کرد.

واژگان کلیدی: سامانه اتوماتیک، تولید گاز، کینتیک تخمیر، مواد خوراکی

مقدمه

برای ارزیابی کیفیت مواد خوراکی مورد استفاده در تغذیه نشخوارکنندگان از روش‌های مختلف درون تنی، درون کیسه ای و برون تنی استفاده می‌شود. روش‌های درون تنی نیاز به صرف هزینه و وقت زیاد دارند و به همین دلیل در دو دهه اخیر استفاده از روش های درون کیسه ای و برون تنی برای ارزیابی ارزش غذایی مواد خوراکی مورد توجه گسترده پژوهشگران واقع شده است (اُرسکوف و همکاران ۱۹۸۰). از آنجا که روش‌های درون کیسه ای نیز نیازمند جراحی دام است و بطور معمول با تعداد کمی حیوان انجام می شوند، استفاده از تکنیک‌های برون تنی بیشتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. تاکنون از روش‌های برون تنی متنوعی برای بررسی کنتیک تخمیر و قابلیت هضم مواد خوراکی نشخوارکنندگان استفاده شده است و یکی از پرطرفدارترین روش‌ها، اندازه‌گیری گاز تولیدی در شرایط تخمیر کنترل شده است (مارسیو و همکاران ۱۹۹۹). در تکنیک تولید گاز، مواد خوراکی مورد نظر با یک منبع میکروبی (مایع شکمبه یا مدفوع) به همراه بافر در بطری‌های درب بسته انکوباسیون می‌شوند. سپس حجم یا فشار گاز تولید شده در زمان‌های مختلف ثبت و با استفاده از حجم گاز تجمعی تولید شده در این زمان‌ها و بکارگیری معادله‌های ریاضی، فراسنجه‌های تجزیه-پذیری و قابلیت هضم مواد خوراکی تخمین زده می شوند (گِتاچو و همکاران ۱۹۹۸).

تاکنون چندین روش برای اندازه‌گیری کینتیک هضم خوراک بر اساس حجم گاز تولیدی پیشنهاد شده است (مِنک و همکاران ۱۹۷۹؛ پِل و اِسکافیلد ۱۹۹۳؛ تئودور و همکاران ۱۹۹٤؛ گروت و همکاران ۱۹۹٦؛ ماریسینو و همکاران ۱۹۹۹ و دِیویس و همکاران ۲۰۰۰) و در این بین روش پیشنهادی تئودور و همکاران (۱۹۹٤) به دلیل سادگی و هزینه کم، یکی از متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده است. اما، این روش دارای اشکالاتی مانند عدم امکان اندازه‌گیری همزمان فشار درون همه ویال‌ها، تخمین چشمی حجم گاز تولید شده، تغییر دمایی ویال‌ها به دلیل زمان مورد نیاز برای اندازه‌گیری و ثبت دستی داده‌ها است (گِتاچو ۱۹۹۸). برای رفع این اشکالات، مارسیو و همکاران (۱۹۹۹) روش نیمه اتوماتیک اندازه-گیری گاز تولیدی را پیشنهاد کردند و بدین ترتیب برخی از محدودیت‌های روش قبلی برطرف شد. اما، در این روش نیز همچنان مشکل اندازه‌گیری فشار گاز با استفاده از سرنگ وجود دارد.

در حال حاضر برای مطالعات تولید گاز، در اغلب آزمایشگاه‌های تغذیه دام ایران از روش دستی مبتنی بر جابجایی آب در ستون‌های شیشه ای مدرج بر اساس فشار گاز تولیدی در ویال‌های حاوی نمونه خوراکی و مایع شکمبه، استفاده می‌شود (فِدوراک و هرودی ۱۹۸۳). این روش دارای خطاهای فردی فراوان، نیازمند یادداشت حجم گاز تولیدی بطور شبانه روزی و ضرورت تخلیه دستی گاز در ساعت‌های مختلف انکوباسیون می‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه طراحی و ساخت یک سامانه خودکار اندازه‌گیری تولید گاز و سپس ارزیابی صحت نتایج آن با روش دستی که به طور متداول در آزمایشگاه‌های تغذیه دام ایران استفاده می‌شود، بود.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه‌های آزمایشی

نمونه‌های مورد مطالعه در این آزمایش شامل علوفه یونجه، کنجاله سویا و کنسانتره گاو شیرده (جدول ۱) از مزرعه آموزشی– پژوهشی لورک وابسته به دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه شدند. نمونه‌های خوراک ابتدا با استفاده از آسیاب مجهز به الک ۱ میلی‌متر[1] پودر شدند، سپس درصد ماده خشک نمونه‌ها با قرار دادن آنها در آون ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت اندازه‌گیری شد. هر نمونه خوراکی با ٤ تکرار، هم روش دستی و هم اتوماتیک، مورد بررسی قرار گرفت.

[1] Wiley mill, Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA

آماده سازی مایع شکمبه و محلول بافر

دو شکمبه از دو راس گوسفند تازه کشتار شده در کشتارگاه نقش جهان خمینی شهر تهیه و سریعا درون کلمن دارای عایق حرارتی قرار داده شد. جیره گوسفندان (بر اساس ماده خشک) شامل کاه یونجه و دانه جو به نسبت ۷۰ به ۳۰ بود. شکمبه‌ها در کمترین زمان ممکن (۱۵ دقیقه) به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ابتدا محتویات ۲ شکمبه مخلوط و سپس با کمک همزن برقی و زیر جریان دی اکسیدکربن گرم با دور تند برای ۳۰ ثانیه به هم زده شد تا باکتری‌های سلولولیتیک چسبیده به ذرات خوراک جدا شوند. سپس، مایع شکمبه با پارچه پنیری ۲ لایه صاف و به محلول‌های بی‌هوازی شده از پیش قرار داده شده در بن ماری در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، اضافه شد. محلول نهایی به دست آمده (محلول کشت + مایع شکمبه) در دمای ۰/٤ ± ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه زیر جریان پیوسته ای از دی اکسید کربن گرم قرار گرفت. در گام بعدی با استفاده از دیسپنسر، ٦۰ میلی‌لیتر از محلول نهایی به داخل ویال‌های حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه (برای خوراک کنسانتره ای، حدود ۳۰۰ میلی‌گرم داخل هر ویال ریخته شد) که از قبل به مدت ۱ شبانه روز در آون ۳۹ درجه سانتی گراد قرار داده شده بودند، ریخته شد و به مدت ۲۰ ثانیه فضای بالای ویال‌ها در معرض جریان دی اکسید کربن گرم قرار گرفت. سپس ویال‌ها داخل بن ماری شیکردار[1] (۲۰ حرکت رفت و برگشتی در دقیقه) در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند. محیط کشت مطابق با محیط پیشنهادی تیلی و تری (۱۹٦۳) و وَن سوست و همکاران (۱۹٦٦) آماده شد. محیط کشت قبل از اضافه کردن مایع شکمبه با مخلوط کردن ۹٤۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲٤۰ میکرولیتر محلول میکرومینرال، ٤۷٤ میلی‌لیتر محلول بافر، ٤۷٤ میلی‌لیتر محلول ماکرومینرال، ۲/٤٤ میلی‌لیتر محلول رزازورین (۱۰۰ میلی گرم رزازورین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به عنوان شاخص احیا و ۹۹ میلی‌لیتر محلول احیا شامل ٤ میلی لیتر سود ۱ مولار، ٦۲۵ میلی-گرم $Na_2S{\cdot}9H_2O$ و ۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر آماده شد. جریان گرم دی اکسید کربن[2] داخل محلول حداقل ٦ ساعت قبل از استفاده از آنها قرار داشت. محلول بافر (مِنک و اِستینگس، ۱۹۸۸) شامل ٤ گرم NH_4HCO_3 و ۳۵ گرم $NaHCO_3$ در ۱ لیتر آب مقطر بود. محلول ماکرومینرال شامل ۵/۷ گرم $Na_2HPO_4{\cdot}12H_2O$، ٦/۲ گرم KH_2PO_4 و ۰/٦ گرم $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ در ۱ لیتر آب مقطر بود. محلول میکرومینرال هم شامل ۱۳ گرم $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ ، ۱۰۰ گرم $MnCl_2{\cdot}4H_2O$، ۱۰ گرم $CoCl_2{\cdot}6H_2O$، و ۸ گرم $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ در ۱ لیتر آب مقطر بود.

اندازه‌گیری گاز تولیدی

در روش دستی، درب ویال‌ها با درپوشی از جنس بوتیل[3] بسته و یک درب آلومینیومی بر روی درپوش بوتیلی پرس شد. حجم گاز با فرو کردن سر سوزن (شماره ۲۳ با طول ۲/٥٤ سانتی‌متر) در داخل درپوش بوتیلی، در زمان‌های ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۲، ۱٦، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون با بررسی میزان حجم جابجایی آب در ستون شیشه‌ای اندازه‌گیری شد (فِدوراک و هرودی ۱۹۸۳).

[1] Memmert, Model WNE 10, Schwabach, Germany

[2] Carbon dioxide gas heater, Tavan Jam Co., Tehran, Iran

[3] 14 mm butyl rubber stopper

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی کنسانتره گاو شیرده (درصد از ماده خشک)

Table 1- Components and chemical composition of dairy cows concentrate (% of DM)

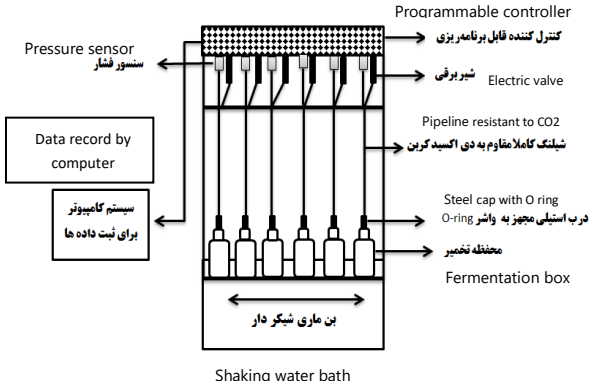
اجزای کنسانتره Concentrate components	درصد از ماده خشک % of DM
جو Barley	35.0
سبوس گندم Wheat bran	20.0
کنجاله تخم پنبه دانه Cottenseed meal	19.0
تفاله چغندر Beet pulp	24.0
مکمل معدنی-ویتامینی Vitamin-Mineral permix	2.0
ترکیب شیمیایی Chemical composition	
ماده‌خشک Dry matter	93.0
پروتئین خام Crude protein	16.0
الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF	36.0
کلسیم Ca	0.2
فسفر P	0.6

در روش اتوماتیک، میزان گاز تولیدی هر ۳۰ دقیقه یک-بار اندازه‌گیری شد و در مجموع ۱٤٤ داده در طول ۷۲ ساعت انکوباسیون به ازای هر ویال در صفحه نرم افزار اکسل ثبت شد. حجم گاز تولیدی تمام نمونه‌ها، در هر دو روش دستی و اتوماتیک، بر اساس میانگین میزان گاز تولید شده در ویال‌های بلانک (فقط حاوی محیط کشت و مایع شکمبه; ٤ ویال) تصحیح شدند.

توصیف سامانه اتوماتیک اندازه‌گیری تولید گاز

شماتیکی از سامانه اندازه‌گیری تولید گاز در شکل ۱ نشان داده شده است. در این سامانه، فشار گاز تولیدی در ویال‌ها (ظرفیت اسمی ٦۰ میلی‌لیتر؛ شکل ۲)، با کمک رابط‌های استیل مجهز به واشر O-ring با شیلنگ مخصوص کاملا نفوذ ناپذیر به دی اکسید کربن به ورودی سنسور فشار و شیر برقی اتصال داده شدند. سنسورهای فشار مورد استفاده[1] قادر به اندازه‌گیری فشار در محدوده ٥- تا ۱۱۰+ کیلو پاسکال بودند. قبل از شروع آزمایش تمام ویال‌ها در سیستم اتوماتیک، زیر فشار ۱۰۰ کیلو پاسکال دی اکسیدکربن به مدت ۱ شبانه روز قرار داده شد تا اطمینان حاصل شود که ملکول دی اکسید کربن هیچ گونه انتشاری از شیلنگ‌ها و اتصالات دیگر به بیرون نداشته باشد. هر ۳۰ دقیقه یکبار داده‌های اندازه‌گیری شده توسط سنسورهای فشار ابتدا با استفاده از کنترل‌کننده قابل برنامه‌ریزی منطقی، به داده‌های دیجیتال تبدیل شدند و سپس این داده‌ها بر روی نرم افزار صفحه گسترده اکسل[2] ثبت شدند. در ابتدای آزمایش سنسورهای فشار در محل آزمایشگاه براساس فشار اتمسفر صفر شدند. برای جلوگیری از اثرات منفی افزایش فشار بر فلور میکروبی داخل ویال‌ها، با استفاده از شیر برقی[3] گاز تجمع یافته در داخل هر ویال بلافاصله پس از ثبت فشار (هر ۳۰ دقیقه یک‌بار) تخلیه می‌شد. در زمان صفر فشار درون همه ویال‌ها (روش دستی و روش اتوماتیک) صفر شد و تولید گاز از زمان $t = 0$، اندازه‌گیری شد.

[1] Digital Pressure Sensor, Autonics PAS 01, South Korea
[2] Microsoft Office Excel, 2007
[3] Parker, Solenoid valve, 7321 BAN00, Italy



شکل ۱- شماتیک سامانه اتوماتیک اندازه گیری تولید گاز

Figure 1- Schematic of automated system for gas production determining

تبدیل فشار گاز اندازه‌گیری شده به میلی‌لیتر گاز

در این آزمایش فشار گاز حاصل از فعالیت میکروبی در هر ویال در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از سنسورهای فشار بر حسب کیلوپاسکال اندازه‌گیری شد. فشار ثبت شده ابتدا با استفاده از قانون گازهای ایدآل (معادله ی ۱) به مول گاز تبدیل شد و سپس بر اساس قانون آواگادرو، مول گاز به میلی‌لیتر گاز تبدیل شد (معادله ی ۲).

معادله ۱: $n = p\,(V/RT)$

که در این معادله:

n = تعداد مول گاز تولید شده

p = فشار گاز (کیلوپاسکال)

معادله ۲: حجم گاز (میلی‌لیتر) = $n \times ۲۲/٤ \times ۱۰۰۰$

V = حجم فضای بالای ویال‌ها (لیتر)

R = ثابت گاز (۸/۳۱٤٤۷۲) (لیتر × کیلوپاسکال × $^{-۱}$ (دما بر اساس کلوین) × $^{-۱}$(مول))

T = دما (کلوین)

شکل ۲- درب استیل مجهز به واشر O-ring قرار گفته بر روی ویال‌ها و شیلنگ نفوذ ناپذیر به دی اکسید کربن برای انتقال گاز تولیدی در واحد زمان به سنسور فشار و شیر برقی (شکل بالایی). درب های استیل مجهز به واشر O-ringمتصل به شیلنگ مقاوم به دی اکسید کربن (شکل پایینی)

Figure 2- Stainless steel cap with O-ring lining on vials and CO_2 impermeable tube equipped to pressure sensor and solenoid valve (Top). Stainless steel caps with O-rings connected to CO2 impermeable tubes (Down)

تعیین پارامترهای تخمیر خوراک

داده‌های تولید گاز با استفاده از افزونه Fitcurve در برنامه نرم افزاری اکسل آنالیز شدند (چِن ۱۹۹۵). در این برنامه داده‌های تولید گاز با معادله‌ی نمایی زیر برازش شدند (اُرسکوف و مَکدونالد ۱۹۹۷).

معادله ۳ $P = a + b\,(1 - e^{-ct})$

که در این معادله:

P = حجم گاز تولیدی در زمان t

a = حجم گاز تولیدی از بخش محلول (میلی‌لیتر)

b = حجم گاز تولیدی از بخش نامحلول (میلی‌لیتر)

$a + b$ = پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر)

c = ثابت نرخ تولید گاز برای بخش گوارش‌پذیر (h^{-1})

t = زمان انکوباسیون (ساعت)

میانگین نرخ تخمیر (میلی‌لیتر گاز در ساعت)، از زمان شروع انکوباسیون تا زمانی که حجم گاز تجمعی نصف مقدار Asymptote رسید، تعریف و با فرمول زیر محاسبه شد (هِرواس و همکاران ۲۰۰۵):

معادله ٤ $$\text{میانگین نرخ تخمیر} = \frac{A \times c}{[(2 \times \ln 2) + (c \times L)]}$$

که در این معادله:

A = Asymptote (میلی‌لیتر)

L = زمان تاخیر (ساعت)

c = نرخ تخمیر (ساعت$^{-1}$)

با استفاده از معادله زیر غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (Y) محاسبه شد (گِتاچو و همکاران ۲۰۰۲):

معادله ٥ $$Y = ۰/۰۲۳۹ \times (GP_{24}) - ۰/۰۶۰۱$$

که در این معادله:

Y = غلظت اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)

GP_{24} = حجم گاز تجمعی پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)

آنالیز آماری

ضریب همبستگی پیرسون داده‌های تولید گاز حاصل شده با دو روش دستی و اتوماتیک با نرم افزار SAS مقایسه و آنالیز شدند (سَس ۲۰۰۲).

نتایج و بحث

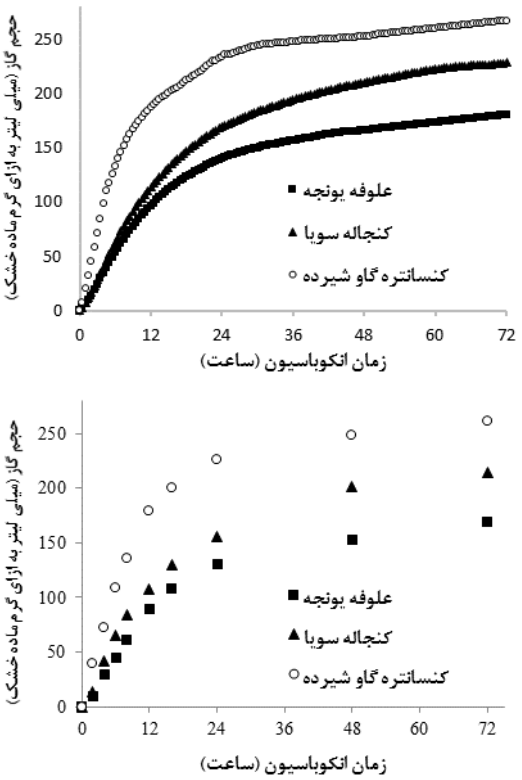
الگوی تخمیر تولید گاز پس از ۷۲ ساعت کار سامانه اتوماتیک و روش دستی در شکل ۳ نشان داده شده است. با مشاهده این شکل می‌توان روند مشابه دو الگوی تخمیر را در دو روش اندازه‌گیری مشاهده کرد. این موضوع بخوبی نشان‌دهنده روند منطقی تولید گاز با توجه به نوع خوراک مورد آزمایش در دو روش دستی و اتوماتیک است. در هر دو روش سرعت تخمیر و تولید گاز برای یونجه کمتر از کنجاله سویا و برای کنجاله سویا کمتر از کنسانتره بود.

نتایج مربوط به تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، متوسط نرخ تخمیر، کینتیک تخمیر میکروبی و حجم گاز تولیدی پس از ٢٤ و ۷۲ ساعت انکوباسیون سه نمونه مورد آزمایش در دو روش دستی و اتوماتیک در جدول ۲ نشان داده شده است. در مطالعه ما، در روش اتوماتیک پس از ٢٤ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون به ترتیب ١٤٠ و ۱۸۰ میلی‌لیتر گاز به ازای گرم ماده خشک علوفه یونجه تولید شد، در حالی که این مقادیر در روش دستی به ترتیب برابر با ۱۳۰ و ١٦٩ میلی‌لیتر گاز به ازای گرم ماده خشک علوفه یونجه بود. همچنین متوسط نرخ تخمیر علوفه یونجه در روش دستی و اتوماتیک به ترتیب ۷/۷۷ و ۷/۷۸ (میلی‌لیتر در ساعت) بود. هِرواس و همکاران (۲۰۰۵) متوسط نرخ تخمیر علوفه یونجه را با مایع شکمبه گرفته شده از گوسفند کانولاگزاری شده ۷/۹۰ میلی لیتر در ساعت گزارش کردند، که با نتایج آزمایش حاضر همخوانی دارد.

تاگلیاپیترا و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از سیستم کاملا اتوماتیک اندازه‌گیری تولید گاز[1]میزان گاز تولید شده دو نوع علوفه یونجه (شماره ۱ و ۲) را اندازه‌گیری کردند. حجم گاز تولیدی پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون به ترتیب برابر با ۱۹۹ و ١٦٦ میلی‌لیتر به ازای هر گرم ماده خشک برای علوفه شماره ۱ و علوفه شماره ۲ بود، که تا حدود زیادی با نتایج آزمایش حاضر مشابه است. کینتیک تخمیر شکمبه‌ای کنجاله سویا نیز توسط همین محققان بررسی شد و حجم گاز پس از ٢٤ و ۷۲ ساعت انکوباسیون به ترتیب۲۵۰ و ۲۷۵ میلی‌لیتر به ازای هر گرم ماده خشک ثبت شد. در مطالعه حاضر حجم گاز تولیدی حاصل از تخمیر میکروبی کنجاله سویا پس از

[1] Ankom^{RF} Macedon, NY, USA Gas Production System, Ankom Technology®

۲٤ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در روش دستی به ترتیب ۱۵٦ و ۲۱۵ میلی‌لیتر به ازای گرم ماده خشک بود، در حالی که در روش اتوماتیک ۱٦۹ و ۲۲۸ میلی‌لیتر به ازای گرم ماده خشک بود. بهر حال نتایج دو روش در آزمایش حاضر تقریبا مشابه و کمتر از نتایج تگلیاپیترا و همکاران (۲۰۱۱) بود.



شکل ۳- الگوی تولید گاز در مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون برای سه نمونه خوراک با روش اتوماتیک (شکل بالایی)و الگوی تولید گاز در مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون برای سه نمونه خوراک با روش دستی (شکل پایینی)

Figure 3- Gas production trend during the 72 h incubation in 3 feed samples by automated method (Top figure) and gas production trend during 72 h in 3 feed samples by manually method (Down figure) (■ Alfalfa hay, ▲Soybean meal, ○ Dairy cow concentrate)

تفاوت‌های مشاهده شده بین اعداد مطالعه حاضر و مطالعات پیشین می تواند به تفاوت در آماده سازی مایع میکروبی، نمونه خوراک و بافر، نوع محلول بافری، فعالیت میکروبی شکمبه، حیوان دهنده مایع شکمبه، نوع جیره و گونه دام نشخوارکننده که از آن مایع شکمبه تهیه می‌شود ارتباط داشته باشد. از سوی دیگر گزارش شده است که زمان نمونه-گیری مایع شکمبه (قبل از خوراک دهی یا پس از خوراک دهی)، روش اندازه‌گیری میزان گاز تولیدی،تکان دادن ویال‌ها در طول زمان انکوباسیون و همچنین مدل‌های ریاضی مورد استفاده برای تخمین پارامترهای تولید گاز از جمله عوامل تاثیرگذار بر نتایج تست تولید گاز هستند (کووون و همکاران ۱۹۹٦؛ اُمِد و همکاران ۱۹۸۹؛ ناگادی و همکاران ۲۰۰۰؛ رایمر و همکاران ۲۰۰۵؛ پِل و اسکافیلد ۱۹۹۳ و لانزاس و همکاران ۲۰۰۷). برای مثال مشاهده شده است که نرخ تخمیر با مایع شکمبه گرفته شده پس از خوراک دهی صبح بیشتر است (کووون و همکاران ۱۹۹٦)، ولی در عین حال مِنک و اِستینگس (۱۹۸۸) گزارش کردند که مایع شکمبه گرفته شده قبل از خوراک دهی باعث کاهش پراکنش در ترکیب و فعالیت مایع شکمبه می‌گردد. تفاوت در ترکیب ماده شیمیایی مواد خوراکی با توجه به اینکه از مناطق جغرافیایی متفاوت تهیه می‌شوند هم می‌تواند از دلایل اصلی پراکنش در میزان گاز تولیدی باشد. بهرحال مشابه بودن نتایج دو روش دستی و اتوماتیک می تواند صحت کار دستگاه را تایید کند. آزمون همبستگی پیرسون برای زمان‌های مختلف تولید گاز (٦، ۲٤ و ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از تخمیر) و همچنین پتانسیل تولید گاز با دو روش دستی و اتوماتیک نشان داد که بیش از ۹۰ درصد همبستگی بین دو روش مورد آزمایش وجود دارد (جدول ۳)، که تاییدی بر کارکرد صحیح سامانه اتوماتیک طراحی شده می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه برخی پارامترهای اندازه‌گیری شده در تکنیک تولید گاز با دو روش دستی و اتوماتیک

Table 2- Comparison of some parameters determined by two automated and manually methods

پارامترهای تولید گاز Gas production parameters	روش اندازه‌گیری گاز تولیدی The methods of determining gas production						میانگین خطای استاندارد SEM
	اتوماتیک Automated			دستی Manually			
	علوفه یونجه Alfalfa hay	کنجاله سویا Soybean meal	کنسانتره دامی Concentrate	علوفه یونجه Alfalfa hay	کنجاله سویا Soybean meal	کنسانتره دامی Concentrate	
اسیدهای چرب کوتاه زنجیر[1] Short chain fatty acids[1]	0.609	0.748	1.058	0.561	0.686	1.02	0.073
متوسط نرخ تخمیر[2] Mean of fermentation rate[2]	7.78	8.81	17.80	7.77	9.13	17.71	1.37
کینتیک تخمیر Fermentation kenetic ثابت نرخ تولید گاز (h^{-1}) Gas production rate constant (h^{-1})	0.06	0.053	0.095	0.068	0.059	0.099	0.002
پتانسیل تولید گاز ($a + b$)[3] Gas production potential ($a+b$)[3]	180	231	259	167	215	255	7.74
حجم گاز تولیدی پس از ۲۴ ساعت[4] Gas production volume after 24 h [4]	140	169	234	130	156	226	8.16
حجم گاز تولیدی پس از ۷۲ساعت[4] Gas production volume after 72 h [4]	180	228	266	169	215	261	7.30

[1] میلی‌مول به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک؛ [2] میلی‌لیتر گاز به ازای گرم ماده خشک در ساعت؛ [3] میلی‌لیتر گاز به ازای گرم ماده خشک؛ [4] میلی‌لیتر گاز به ازای گرم ماده خشک

[1] mMol per 200 mg of DM; [2] mL of gas per g of DM in h; [3] mL of gas per g of DM; [4] mL of gas per g of DM

جدول۳- همبستگی پیرسون بین برخی زمان‌های تولید گاز؛ اندازه‌گیری شده با دو روش دستی و اتوماتیک

Table 3- Pearson correlation between some gas production times, determined by automated and manually methods

	تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون (ساعت) Gas production at different time of incubation (h)					پتانسیل تولید گاز Gas production potential
	2	6	24	48	72	
ضریب همبستگی پیرسون Pearson correlation coefficient	0.834	0.941	0.965	0.958	0.960	0.970
معنی داری P value	0.0052	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

نتیجه‌گیری

یافته‌های این آزمایش نشان داد که سامانه اتوماتیک می‌تواند داده‌های تولید گاز ناشی از تخمیر مواد خوراکی در شرایط کنترل شده را با دقت بالا، زحمت کمتر و بدون تاثیر خطاهای فردی اپوراتور ثبت کند. بنابراین استفاده از این سامانه بجای روش‌های دستی رایج، دقت و تکرارپذیری نتایج را بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش خواهد داد. از سوی دیگر می‌تواند قابل رقابت با برخی سامانه‌های اتوماتیک وارداتی باشد که در این صورت ضمن صرفه جویی ارزی، گارانتی و خدمات پشتیبانی آن نیز بومی‌سازی شده و براحتی قابل دسترس خواهد بود.

سپاسگزاری

از اساتید گروه علوم دامی و بویژه کارشناسان آزمایشگاه تغذیه خوراک دام دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان به واسطه همکاری در کلیه مراحل ساخت و ارزیابی این سامانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

Chen X, 1995. Fitcurve Macro. IFRU, The Macaulay Institute, Aberdeen, UK.

Cone JW, Van Gelder AH, Visscher GJW and Oudshoorn L, 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. Animal Feed Science and Technology 61: 113–128.

Davies Z, Mason D, Brooks A, Griffith G, Merry R and Theodorou M, 2000. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. Animal Feed Science and Technology 83: 205–221.

Fedorak PM and Hrudey SE, 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. Environmental Technology 4: 425–432.

Getachew G, Blümmel M, Makkar HPS and Becker K, 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Animal Feed Science and Technology 72: 261–281.

Gatachew G, Makkar HPS and Becker K, 2002. Tropical browse: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. The Journal of Agricultural Science 139: 341–352.

Groot JCJ, Cone JW, Williams BA, Debersaques FMA and Lantinga EA, 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology 64: 77–89.

Hervás G, Frutos P, Giráldez FJ, Mora MJ, Fernández B and Mantecón ÁR, 2005. Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid inoculum for in vitro gas production techniques. Animal Feed Science and Technology 123–124: 107–118.

Lanzas C, Fox D and Pell A, 2007. Digestion kinetics of dried cereal grains. Animal Feed Science and Technology 136: 265–280.

Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS and Theodorou MK, 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Animal Feed Science and Technology 79: 321–330.

Menke K, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D and Schneider W, 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. The Journal of Agricultural Science 93: 217–222.

Menke KH and Steingass H, 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and Development 23:103–116.

Nagadi S, Herrero and M Jessop NS, 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. Animal Feed Science and Technology 87: 231–239.

Omed, HM, Axford RFE, Chamberlain AG and Givens DI, 1989. A comparison of three laboratory techniques for estimation of the digestibility of feedstuffs for ruminants. The Journal of Agricultural Science 44: 35–39.

Ørskov E, Hovell F and Mould F, 1980. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. Tropical Animal Production 5: 195–213.

Ørskov E and McDonald I, 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. The Journal of Agricultural Science 92: 499–503.

Rymer C, Williams BA, Brooks AE, Davies DR and Givens DI, 2005. Inter-laboratory variation of in vitro cumulative gas production profiles of feeds using manual and automated methods. Animal Feed Science and Technology 123–124: 225–241.

Pell A and Schofield P, 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. Journal of Dairy Science 76: 1063–1073.

SAS Institute. 2002. SAS User's Guide: Statistics. Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Tagliapietra F, Cattani M, Hansen HH, Hindrichsen IK, Bailoni L and Schiavon S, 2011. Metabolizable energy content of feeds based on 24 or 48 h *in situ* NDF digestibility and on *in vitro* 24 h gas production methods. Animal Feed Science and Technology 170: 182–191.

Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB and France J, 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology 48: 185–197.

Tilley JM and Terry RA, 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. Grass and Forage Science 18: 104–111.

Van Soest PJ, Wine RH and Moore LA, 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. Pp. 438–441. Proceedings of the 10th International Congress on Grassland. Helsinki, Finland.

Design, development and evaluation of a fully automated system for gas production measurement and microbial fermentative kinetic of feeds

A Riasi[1]*, F Ahmadi[2], HR Moienodini[3], SMH Rahavi[4] and H Khoshooi[5]

Received: July 31, 2014 Accepted: November 25, 2016
[1]Associated Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[2]MSc, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
[3]MSc, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[4]MSc, Department of Mechanic, Faculty of Engineering, Islamic Azad University, Khomainy Shahr, Iran
[5]BSc, Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
*Corresponding Author: Email: ariasi@cc.iut.ac.ir

Introduction: The *in vivo*, *in situ* and *in vitro* methods have been used for feedstuff evaluation. Gas production technique is known as a reliable *in vitro* methods which could be accomplished by manual or automated systems. Manual gas pressure measurement is tiresome, labor-intensive, and less repeatable. Heretofore, several methods are introduced for determining kinetic of feed digestion based gas production volume. Between the conventional methods, the method introduced by Theodorou et al. (1994) was simple and low cost, but it had some disadvantages. Mauricio et al. (1999) suggested a semi-automatic method for gas production evaluation. In most Iranian nutritional lab the manual method using glass syringes is used for gas production assays. This method has individual errors and need to discharge gas at different times of assay. So the objectives of this study were to develop and validate a fully-automated gas production system to facilitate the study of the microbial fermentative kinetics and animal science studies.
Material and methods: Three representative feeds (soybean meal, alfalfa hay, and dairy cow concentrate) were prepared form the education and research farm (Lavark Farm, Isfahan, Iran). Then, the samples were milled using a Wiley mill equipped with 1 mm screen. On the other hand, ruminal fluid was obtained from two ewes in a slaughterhouse. The ruminal fluid was filtrated using 2 layer cheese cloth. Then, the feed samples were incubated with buffered rumen fluid inside the volume-calibrated serum bottles. Gas pressure from the head-space of each bottle was transferred to the pressure sensor through a stainless-steel connection fitting and a CO_2-resistant hose. Gas pressure data were recorded on an Excel spreadsheet at 30-min intervals during an incubation period of 72 h. Accumulated head-space gas pressure was vented using an electric gas valve immediately after each gas pressure record. To validate the accuracy of the automated system, another experiment was simultaneously performed and gas volume in each butyl rubber-sealed serum bottle was manually measured using a water displacement apparatus after 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, and 72 h of incubation, and then compared with those measured with the automated system. The Pearson correlation coefficients obtained from two methods of manually and fully-automated methods were analyzed by SAS software (SAS, 2002).
Results and discussion: Results showed that alfalfa hay had lower fermentation and gas production rate than those the other samples. In automated method, gas volume produced was about 140 and 180 ml/g DM alfalfa hay after 24 and 72 h incubation, respectively. While, these volumes were 130 and 169 ml/g DM alfalfa hay in manual method. In line with Hervás et al. (2005) the mean fermentation rate for alfalfa hay was 7.77 and 7.78 ml/h in manual and automated methods, respectively. In the present study, after 24 and 72 h soybean meal incubation the gas volume was about 156 and 215 ml/g DM in manual method and 169 and 228 ml/g DM in automated methods,

respectively. This results were somewhat lower than that the data reported by Tagliapietra et al. (2011) who tested the soybean meal fermentation kenetic by an automated gas production system. The discrpancy could be attributed to the difference in sample preparing, buffer solutions, rumen fluid collection source and the diet of animal before rumen fluid collection. On the other hand, it is reported that the time of rumen fluid sampling (before and after feeding), the method for determining gas production, vial shaking during the incubation and the mathemtical models are some factors mat affect on gas production data (Cone et al. 1996; Nagadi et al. 2000; Lanzas et al. 2007). Cone et al. (1996) demonstrated that fermentation rate was higher when the rumen fluid collected after morning feeding. Menke and Steingass (1988) reported that rumen fluid collected before feeding had lower differentiation in composition and activity. The Pearson correlation coefficient for several incubation times (6, 24, 48 and 72 h) as well as gas production potential was higher than 90% which verifying the gas pressure data generated by the automated system.

Conclusion: In general, the results of the present study showed that the fully-automated system in compare to manual gas production measurement, had high performance in determining the gas pressure with less labor.

Keywords: Automatic system, Gas production, Fermentation kinetic, Feedstuff