



دانشگاه گیلان

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان

جلد ششم، شماره اول، ۱۳۹۷

<http://ejrr.gau.ac.ir>

تأثیر سطوح مختلف بیوجار حاصل از پوست گردو و بستر مرغ بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه و تولید متان به‌روش برون تنی

*اعظم میرحیدری^۱، نورمحمد تربتی‌نژاد^۲، سعید حسنی^۲ و پیروز شاکری^۳

^۱فارغ التحصیل دکتری و ^۲استاد دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۳بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: بیوجار نوعی ماده غنی از کربن است که از سوختن زیست توده‌های کشاورزی و دامی در محیطی با اکسیژن کم تولید می‌شود. این ماده با داشتن ساختاری متخلخل و سطح ویژه وسیع، جایگاهی مناسب برای استقرار و توسعه بیوفیلیم حاوی جمعیت‌های مختلف میکروبی در محیط‌های بی‌هوازی از جمله شکمبه فراهم کرده و سبب رشد و تکثیر میکروبی و بهبود بازده تخمیر می‌شود. ساختار پر منفذ بیوجار تشکیل کلونی‌های میکروبی از جمله متانوتروف‌ها (اکسیدکننده متان) را تسهیل می‌کند و با افزایش جمعیت آن‌ها و همچنین استقرار کلونی‌های متانوژن و متانوتروف در سطح بیوجار اکسیداسیون متان افزایش می‌یابد. این تحقیق به منظور بررسی اثر سطوح مختلف بیوجارهای حاصل از پوست گردو و بستر مرغ بر میزان تولید گاز، قابلیت هضم، تولید متان و آمونیاک به‌روش آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای تولید بیوجار، پوست گردو و بستر مرغ به‌صورت مجزا در حلب‌های دردار باحداقل نفوذ اکسیژن به مدت ۳ ساعت سوزانده شدند. سطوح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد از هر بیوجار به جیره پایه شامل: یونجه، کاه گندم، سبوس گندم، دانه جو، دانه ذرت، کنجاله سویا، مکمل معدنی و ویتامینی و نمک بانسبت ۴۰ به ۶۰ علوفه به کنسانتره اضافه گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار شامل: ۱- شاهد (جیره پایه بدون بیوجار) ۲- جیره پایه + ۰/۵ درصد بیوجار پوست گردو ۳- جیره پایه + ۱ درصد بیوجار پوست گردو ۴- جیره پایه + ۱/۵ درصد بیوجار پوست گردو ۵- جیره پایه + ۰/۵ درصد بیوجار بستر مرغ ۶- جیره پایه + ۱ درصد بیوجار بستر مرغ ۷- جیره پایه + ۱/۵ درصد بیوجار بستر مرغ با سه تکرار اجرا شد. انکوباسیون با استفاده از مایع شکمبه چهار راس گوسفند کرمانی مجهز به فیستولای شکمبه‌ای، ۲ ساله باوزن ۵۰/۵ کیلوگرم تهیه شده دو ساعت بعد از تغذیه صبح، انجام شد. تولید گاز نمونه‌ها در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در شرایط آزمایشگاهی تعیین گردید. در پایان ۲۴ ساعت، قابلیت هضم ماده خشک، غلظت نیتروژن آمونیاکی و تولید متان تعیین و فراسنجه‌های تولید گاز، انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و قابلیت هضم ماده آلی برآورد گردید.

یافته‌ها: افزودن بیوجار به جیره‌های آزمایشی کاهش تولید گاز در زمان ۲۴ و ۹۶ ساعت انکوباسیون را به‌همراه داشت و سبب کاهش معنی‌دار انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و قابلیت هضم ماده آلی شد. سطوح ۱ و ۱/۵ درصد بیوجار

*مسئول مکاتبه: az_mirhidar@yahoo.com

پوست گردو و ۱/۵ درصد بستر مرغ سبب افزایش قابلیت هضم ماده خشک نسبت به جیره شاهد شدند. غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزودن بیوچار پوست گردو و بستر مرغ در مقایسه با شاهد کاهش یافت. سطح ۱ درصد بیوچار پوست گردو و ۱/۵ درصد بیوچار بستر مرغ بیشترین کاهش را در مقدار و درصد متان تولید شده نسبت به شاهد نشان دادند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار ۱ درصد بیوچار پوست گردو و ۱/۵ درصد بیوچار بستر مرغ می تواند باعث کاهش تولید متان، آمونیاک و بهبود بازده تخمیر شکمبه شود. بنابراین، استفاده از ۱ درصد بیوچار پوست گردو و یا ۱/۵ درصد از بیوچار بستر مرغ می تواند برای دستکاری تخمیر در شکمبه و کاهش تولید گاز متان مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: بیوچار، متان، زیست توده، قابلیت هضم، آمونیاک

مقدمه

متان یکی از مهم ترین گازهای گلخانه ای است که علاوه بر نقش آن در تغییرات اقلیمی و گرم شدن زمین، تولیدات حاصل از واکنش شیمیایی این گاز بامواد ناشی از سوختن ترکیبات هیدروکربنی، سلامت میلیون ها انسان در سطح جهان را تهدید می کند (۲۴). حدود ۵۰ تا ۶۰ درصد از کل گازهای منتشر شده از مزارع پرورش نشخوارکنندگان را متان تشکیل می دهد (۳۸). این حیوانات در هر روز می توانند حدود ۲۵۰ تا ۵۰۰ لیتر متان تولید کنند که موجب اتلاف ۲ تا ۱۲ درصد از انرژی خام خوراک می شود و به همین دلیل کاهش انتشار متان از دستگاه گوارش نشخوارکنندگان یک ضرورت جدی برای کاهش گازهای گلخانه ای و بهبود راندمان استفاده از انرژی خوراک مطرح شده است (۱۵). متخصصین تغذیه دام با هدف به حداقل رساندن اتلاف مواد مغذی در شکمبه و کاهش آلاینده های زیست محیطی به دنبال دستکاری اکوسیستم میکروبی شکمبه با استفاده از افزودنی های خوراکی می باشند (۴۵). برخی افزودنی های شیمیایی خوراکی از قبیل یونوفرها، ممانعت کننده های تولید متان و عوامل کاهنده جمعیت پروتوزوا مورد مطالعه قرار گرفته اند، در حالی که نگرانی هایی در رابطه باوجود بقایای این مواد در محصولات دامی و افزایش باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها وجود دارد (۴۰).

اخیراً تحقیقات نشان داده است ترکیبات کربنی جایگزینی مناسب برای برخی از افزودنی های خوراکی از جمله آنتی بیوتیک ها هستند (۶ و ۴۲)، و گزارشاتی از تاثیر ترکیبات کربنی بر بهبود الگوی تخمیر شکمبه و کاهش تولید متان وجود دارد (۲۵، ۲۶ و ۲۷). بیوچار نوعی ماده غنی از کربن و متخلخل است که از تجزیه حرارتی زیست توده (بقایای گیاهان زراعی، جنگلی و فضولات دامی) طی فرآیند پیرولیز (تجزیه حرارتی) در دمای بالا تحت شرایطی با اکسیژن محدود تولید می شود (۲۲). فرآیند تولید بیوچار مانند ذغال چوب است. ذغال چوب و ذغال چوب فعال شده جهت بهبود عملکرد رشد، ضریب تبدیل خوراک و به عنوان سمزدا به جیره نشخوارکنندگان افزوده می شوند (۲، ۴۹ و ۵۱). بیوچار در مقایسه با ذغال چوب نواحی سطحی وسیع تر و ساختار متخلخل تری دارد که قابلیت آن را در جذب گازها افزایش می دهد و استفاده از آنها را جهت افزودنی خوراک دام مطلوب می کند (۵ و ۲۲). یکی از ویژگی های بیوچارها سطح ویژه^۱ (SSA) بالا (۴۰-۲ مترمربع به ازای هر گرم) است که به همراه ساختار حلقوی و منافذ ریز، نقش مهمی در توانایی جذب آنها دارد (۲۲) سطح ویژه بیوچارها بسیار

1- Specific surface area(SSA)

متغیر بوده و گستره وسیعی دارد که تحت تاثیر زیست توده اولیه و دمای پیرولیز^۱ می باشد (۸ و ۱۰ و ۲۱). بیوچار به عنوان ماده افزودنی خوراک با داشتن ویژگی های خاص ساختمانی محیطی مطلوب برای تراکم مواد آلی و تجمع میکروارگانیسم های شکمبه فراهم می کند و افزایش سرعت تبدیل ترکیبات گیاهی به تولیدات نهایی را موجب می شود (۱۷). تفاوت در ویژگی های ساختمانی بیوچارها با تاثیر بر جذب گازها، مواد آلی و تجمع میکروارگانیسم ها، سرعت هضم و تخمیر شکمبه ای را تحت تاثیر قرار می دهند. سطح ویژه وسیع بیوچار مکان مناسبی برای چسبیدن بیوفیلم های حاوی جمعیت های مختلف میکروبی در داخل شکمبه فراهم می کند و موجب ارتباطات نزدیک تر و بهبود انتقال مواد بین جمعیت های میکروبی می شود، که ثبات بهتر آنها و افزایش بازده واکنش های تخمیری را در پی دارد (۱، ۲۵، ۲۶ و ۲۷). بهبود بازده تخمیر میکروبی توسط بیوچار هم در شرایط آزمایشگاهی (۲۵) و هم در دام زنده (۲۶) گزارش شده است. مطالعات دیگری اثر مثبت بیوچار در بهبود تخمیر شکمبه را از طریق جذب سموم خوراک بیان کرده اند (۱۳، ۴۲ و ۵۰). تحقیقات نشان داده است استفاده از بیوچار در خاک مزارع برنج با افزایش فراوانی متانوتروف ها (اکسیدکننده متان) به متانوژن ها انتشار متان را کاهش داد (۲۹). مطالعات میتسوموری (۲۰۰۲) نشان داد اکسیداسیون متان در شکمبه تا حدودی توسط پروتئوباکترهای متانوتروف که در مایع شکمبه و چسبیده به دیواره شکمبه وجود دارند انجام می شود (۳۴) اما تعداد کم و خروج سریع این میکروارگانیسم ها از شکمبه بازدهی آنها را در اکسیداسیون متان کاهش می دهد (۱۶ و ۴۸) از این رو ساختار پر منفذ بیوچار تشکیل کلونی های متانوتروف در شکمبه را آسان می کند و باتقویت جمعیت آنها و

استقرار نزدیک به هم کلونی های متانوژن و متانوتروف در سطح بیوچار اکسیداسیون متان را افزایش می دهد (۲۸). بر اساس مطالعات انجام شده بیوچار انتشار متان را هم در شرایط آزمایشگاهی (۲۵، ۲۷ و ۲۸) و هم در دام زنده (۲۶) کاهش داده است. در تحقیقی افزودن بیوچار به جیره در طی انکوباسیون آزمایشگاهی بدون اینکه اثری بر قابلیت هضم ماده خشک و دیواره سلولی داشته باشد، تولید متان را ۱۱ تا ۱۷ درصد کاهش داد (۱۴). مطالعات نشان داده است استفاده از مایع شکمبه گاوهای مصرف کننده بیوچار سبوس برنج (۰/۶۲ درصد ماده خشک جیره) در طی انکوباسیون آزمایشگاهی به همراه افزودن بیوچار (۱/۵ درصد ماده خشک) به جیره آزمایشی سبب بهبود معنی داری در تخمیر شکمبه و کاهش انتشار متان گردید (۲۷). در گزارشی بهبود ضریب تبدیل خوراک با افزودن ۰/۶ درصد بیوچار سبوس برنج به جیره گاوهای نر زبو به کاهش ۲۲ درصدی تولید متان نسبت داده شد (۲۶). اهمیت بیوچار به دلایل زیادی از جمله تولید آن از مواد زائد و ارزان قیمت، جذب سموم خوراک (۴۲ و ۵۲) حاصلخیزی خاک با استفاده از کود دام های مصرف کننده بیوچار (۲۰، ۲۳ و ۴۱)، کاهش انتشار متان (۱۴ و ۲۶) و بهبود قابلیت هضم خوراک (۲۵، ۲۶ و ۲۷) در منابع معتبر علمی گزارش شده است. اثرات سودمند بالقوه مواد سوخته شده در جیره گاو مطرح شده است اما به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز دارد، تا اثر بیوچارهای تهیه شده از زیست توده های گیاهی و حیوانی بر فعالیت های تخمیر شکمبه، تولید آمونیاک و متان مورد آزمایش قرار گیرد. این مطالعه به منظور بررسی تاثیر سطوح مختلف بیوچار تولید شده از پوست گردو و بستر مرغ بر فراسنجه های تخمیری شامل تولید گاز، آمونیاک، متان و قابلیت هضم باهدف استفاده از زیست توده های گیاهی و جانوری فراوان در

باسبست ۴۰ به ۶۰ علوفه به کنسانتره تنظیم شد (۳۷) و نسبت‌های ۱،۰/۵ و ۱/۵ درصد هر یک از بیوپچارها به جیره پایه افزوده شد و با آسیاب مجهز به غربال ۱ میلی‌متری آسیاب شدند. مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم از هر جیره آزمایشی با ۹ تکرار (۳ تکرار برای اندازه‌گیری تولید گاز، ۳ تکرار برای اندازه‌گیری تولید متان و ۳ تکرار برای اندازه‌گیری قابلیت هضم ماده خشک) در داخل شیشه‌های سرم ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. مایع شکمبه ۲ ساعت بعد از وعده خوراک صبح از ۴ راس گوسفند کرمانی مجهز به فیستولای شکمبه‌ای، هم‌سن (۲ساله)، باوزن تقریباً برابر (۵۰/۵ کیلوگرم) که به‌صورت گروهی تغذیه می‌شدند اخذ گردید. این گوسفندان باجیره مخلوط شامل: ۰/۵ کیلوگرم یونجه خشک، ۰/۲ کیلوگرم کاه گندم، ۰/۳ کیلوگرم جو، ۰/۲۵ کیلوگرم کنجاله پنبه‌دانه و ۰/۰۲۵ کیلوگرم مکمل ویتامینی و مواد معدنی در دو وعده تغذیه می‌شدند. مایع شکمبه در فلاسک دردار به آزمایشگاه منتقل شد و با ۴ لایه پارچه متقال و تحت گاز دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد صاف شد. محلول‌های موردنیاز برای تهیه بزاق مصنوعی بر اساس روش پیشنهادی منک و استینگایس (۱۹۸۸) آماده گردید (۳۳). مقدار ۳۰ میلی‌لیتر محلول بافر و مایع شکمبه به‌هر یک از شیشه‌های حاوی نمونه اضافه گردید. به‌داخل هر شیشه ۱۵ ثانیه دی‌اکسیدکربن تزریق شد و بلافاصله درپوش لاستیکی شیشه‌ها گذاشته شد و با استفاده از محافظ‌های آلومینیومی مخصوص پرس گردید. شیشه‌ها به‌داخل گرمخانه تکان‌دهنده با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. به‌منظور تصحیح گاز تولیدی بامنشأ مواد خوراکی موجود در مایع شکمبه، تعداد چهار شیشه که تنها حاوی مایع شکمبه و بافر بود (بلانک) به‌صورت هم‌زمان باشیشه‌های حاوی نمونه داخل دستگاه قرار

منطقه جهت تعیین سطح مناسب از هر کدام در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تولید بیوپچار: پوست گردو پس از جداسازی پوسته سبز و نرم رویی و مغز داخلی گردو تهیه شد. بستر مرغ مورد استفاده مخلوطی از فضولات (ادرار و مدفوع)، مواد بستر شامل سبوس برنج، پر و ریخت و پاش خوراک بود که از یک مزرعه پرورش مرغ گوشتی تهیه گردید. هر یک از مواد اولیه هواخشک، به‌صورت مجزا داخل حلب‌های کوچک دردار قرار داده شدند. حلب‌های حاوی هر یک از مواد اولیه، داخل بشکه بزرگتری بامناظری در ته گذاشته شدند. بشکه بزرگ باچوب پر شد و با یک در دودکش‌دار بسته شد. منبع حرارتی زیر بشکه قرار گرفت و هم‌زمان چوب‌های داخل بشکه نیز مشتعل شدند. دمای داخل بشکه به‌وسیله ترمومتر اندازه‌گیری و به‌وسیله کم یا زیاد کردن شعله زیر بشکه، کنترل گردید. فرآیند سوختن به‌مدت ۳ ساعت در دمای حدوداً ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس مواد از داخل حلب‌ها خارج و باپاشش آب روی آن‌ها سرد شدند و در برابر آفتاب خشک گردیدند.

اندازه‌گیری میزان تولید گاز: به‌منظور تعیین تأثیر استفاده از سطوح مختلف بیوپچار پوست گردو و بستر مرغ بر تخمیرپذیری جیره پایه از روش آزمایشگاهی تولید گاز ارائه شده توسط فدوراک و هرودی (۱۹۸۳) استفاده شد (۱۱). در این روش، جابه‌جایی آب در داخل لوله‌های آزمایشی مدرج که به شیشه‌های حاوی نمونه خوراک و مایع شکمبه انکوباسیون شده متصل است، مقدار گاز تولیدی را نشان می‌دهد. ابتدا یک جیره پایه (جدول ۱) بر اساس احتیاجات بره‌های پرواری^۱

داده شد. میزان گاز تولیدی در ساعات ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ انکوباسیون ثبت گردید. حجم گاز تولیدی بر اساس وزن نمونه‌ها در هر زمان با استفاده از رابطه زیر تصحیح گردید:

$$V = (V_t - V_b) \times \frac{200}{W}$$

V = حجم گاز تصحیح شده بر حسب میلی لیتر به ازای ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک نمونه خوراک، V_t = حجم گاز تولیدی در شیشه‌های حاوی نمونه ماده خوراکی بر حسب میلی لیتر، V_b = حجم گاز تولید شده در شیشه‌های فاقد نمونه ماده خوراکی بر حسب میلی لیتر، W = وزن نمونه ماده خوراکی بر حسب میلی گرم ماده خشک.

جدول ۱: اجزای تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی (درصد ماده خشک).

Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets (%DM).

Treatments تیمارها						شاهد Control	اجزای جیره (درصد) Ingredients (%)
بیوجار بستر مرغ Chicken manure biochar			بیوجار پوست گردو Walnut shell biochar				
1.5	1	0.5	1.5	1	0.5	-	سطح بیوجار Biochar level
30	30	30	30	30	30	30	یونجه Alfalfa
9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	کاه گندم Wheat straw
1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	سبوس گندم Wheat bran
48.2	48.6	49.0	48.2	48.6	49.0	49.4	دانه جو Barley seed
4	4	4	4	4	4	4	دانه ذرت Corn seed
3.6	3.7	3.8	3.6	3.7	3.8	3.9	کنجاله سویا Soybean meal
1	1	1	1	1	1	1	مکمل معدنی و ویتامینی ^۱ Mineral-vitamin premix
0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	نمک Salt
							ترکیبات شیمیایی (درصد) Chemical composition (%) ^۲
90.08	90.54	91.00	90.08	90.54	91.00	91.46	ماده خشک Dry matter
12.87	12.96	13.05	12.87	12.96	13.05	13.15	پروتئین خام Crude protein
0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	کلسیم Calcium
0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32	فسفر Phosphorus
2.50	2.52	2.53	2.50	2.52	2.53	2.55	انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری در کیلوگرم) Metabolizable Energy (Mcal/kg)

^۱ در هر کیلوگرم جیره: ۹۹/۲ میلی گرم منگنز، ۵۰ میلی گرم آهن، ۸۴/۷ میلی گرم روی، ۱۰ میلی گرم مس، ۱ میلی گرم ید، ۰/۲ میلی گرم سلنیوم، ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D، ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین E. ^۲ برآورد شده بر اساس (NRC, 2007).

(میلی لیتر در ساعت) و t زمان انکوباسیون (ساعت) می باشد، که با استفاده از نرم افزار Fitcurve محاسبه شد (۴). هم چنین از روابط زیر برای برآورد انرژی قابل سوخت و ساز، قابلیت هضم ماده آلی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر استفاده شد (۳۳).

محاسبه فراسنجه های تولید گاز و قابلیت هضم ماده خشک: برای تخمین فراسنجه های کینتیک تولید گاز از معادله $P = b(1 - e^{-ct})$ استفاده شد (۳۹) که در آن P : میزان گاز تولید شده در زمان t ; b پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر)؛ c ثابت نرخ تولید گاز از بخش نامحلول

رابطه (۱):

$$(MJ/kg DM) = 1/06 + 0/157 \times GP + 0.0084 \times CP + 0.022EE - 0.0081 \times XA$$

رابطه (۲):

$$(g/100gDM) = 14.88 + 0.889 \times GP + 0.45 \times CP + 0.0651 \times XA$$

رابطه (۳):

$$(mmol/200mg DM) = 0.0222GP - 0.00425$$

سود جذب می شود و گاز باقی مانده به عنوان متان اندازه گیری گردید (۹).

GP = گاز تولید شده از ۲۰۰ میلی گرم نمونه پس از ۲۴ ساعت، CP = درصد پروتئین خام، EE = درصد چربی خام و XA = درصد خاکستر در نمونه ماده خوراکی می باشد.

تجزیه آماری داده ها

داده های حاصل از این آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با هفت تیمار شامل: ۱- شاهد (جیره پایه بدون بیوچار) ۲- جیره پایه + ۰/۵ درصد بیوچار پوست گردو ۳- جیره پایه + ۱ درصد بیوچار پوست گردو ۴- جیره پایه + ۱/۵ درصد بیوچار پوست گردو ۵- جیره پایه + ۰/۵ درصد بیوچار بستر مرغ ۶- جیره پایه + ۱ درصد بیوچار بستر مرغ ۷- جیره پایه + ۱/۵ درصد بیوچار بستر مرغ و سه تکرار با استفاده از برنامه آماری SAS ویرایش ۹/۱ و رویه GLM تجزیه آماری شدند. برای تجزیه داده ها از مدل آماری زیر استفاده گردید و میانگین ها با آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. از چند جمله ای های متعامد برای بررسی روند تغییرات تولید گاز و فراسنجه های تولید گاز استفاده شد (۴۴).

برای محاسبه ناپدید شدن ماده خشک در پایان ۲۴ ساعت انکوباسیون محتوی شیشه ها فیلتر شدند و پس از خشک شدن آن ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد توزین و قابلیت هضم ظاهری ماده خشک نمونه ها تعیین گردید.

اندازه گیری نیتروژن آمونیاکی و گاز متان: غلظت نیتروژن آمونیاکی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون باروش برودریک و کنگ (۱۹۸۰) با استفاده از معرف فنل هیپوکلریت و استاندارد آمونیاک و بادستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد (۳). پس از ثبت میزان گاز تولیدی زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون برای اندازه گیری مقدار متان تولید شده، ۴ میلی لیتر سود (۱۰ مولار) به محتویات شیشه ها اضافه گردید. با تزریق سود گاز دی اکسید کربن توسط

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

که در این مدل:

γ_{ij} = هر مشاهده، μ = میانگین کل، T_i = اثر تیمار و ϵ_{ij} = اثر خطای آزمایشی می‌باشند.

نتایج و بحث

میزان گاز تولیدی و فراسنجه‌های تولید گاز: تأثیر افزودن سطوح مختلف بیوچار پوست گردو و بستر مرغ به جیره پایه بر گاز تولیدی حاصل از تخمیر پس از ۲۴ و ۹۶ ساعت انکوباسیون، پتانسیل تولید گاز (b) و نرخ تولید گاز در هر ساعت (c) در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد بین جیره شاهد و جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف بیوچار، به جز جیره ۱ درصد بیوچار گردو و ۱/۵ درصد بیوچار بستر مرغ تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0/01$) به طوری که با افزودن بیوچار پوست گردو به جیره پایه روند تغییرات تولید گاز و فراسنجه‌های تولید گاز؛ به صورت منحنی درجه سه ($p < 0/01$) و با افزودن بیوچار بستر مرغ به جیره پایه تغییرات تولید گاز و پتانسیل تولید گاز از روند درجه دو ($p < 0/01$) و نرخ تولید گاز از روند درجه سه ($p < 0/01$) پیروی کردند. در مغایرت با نتایج این آزمایش، گزارش شده است افزودن ۸۱ گرم از بیوچارهای (co (Chestnut Oak), yp (Yellow Poplar), wp (White Pine) به ازای هر کیلوگرم ماده خشک جیره پایه (علوفه گراس اُرچارد) تولید گاز به روش آزمایشگاهی را افزایش داد (۳۲). مقایسه بین مقدار گاز تولیدی با استفاده از مایع شکمبه گاوهای مصرف‌کننده بیوچار سبوس برنج (۰/۶ درصد ماده خشک) و مایع شکمبه گاوهایی که بیوچار دریافت نکردند نشان داد، تولید گاز با مایع شکمبه گاوهای مصرف‌کننده بیوچار بیشتر از گروه دیگر بود که به افزایش اولیه جمعیت میکروبی در مایع شکمبه گاوهای مصرف‌کننده بیوچار نسبت داده شد. همچنین در این مطالعه انکوباسیون کنجاله برگ و ریشه کاساوا

به همراه ۱/۵ درصد از بیوچار سبوس برنج با استفاده از مایع شکمبه گاوهای مصرف‌کننده بیوچار، سبب افزایش معنی‌داری در گاز تولید شده نسبت به گروه شاهد (فاقد بیوچار) گردید. علت افزایش تولید گاز در این مطالعه را نیز پویایی و فعالیت بیشتر جمعیت میکروبی در حضور بیوچار بیان کردند (۲۷). برخی از مطالعات نیز متفاوت با نتایج ما، تغییری در مقدار تولید گاز آزمایشگاهی، با افزودن ۵ درصد بیوچار سبوس برنج به ریشه کاساوا مشاهده نکردند (۲۵). در مطالعه دیگری با افزودن بیوچار حاصل از علوفه ذرت و چوب صنوبر به علوفه ری‌گراس خشک و سیلو شده اثر معنی‌داری بر میزان تخمیرپذیری و تولید گاز آزمایشگاهی مشاهده نشد همچنین در این مطالعه مقدار تولید گاز با استفاده از بیوچار تولید شده در دمای بالا (550°C) کمتر از بیوچار تولید شده در دمای پایین (350°C) بود. که این اثر به منافذ ریزتر و ظرفیت جذب بالاتر گاز، توسط بیوچار تولید شده در دمای بالا نسبت داده شد (۴۱). مطالعات انجام شده بر روی بیوچارهای تولید شده از چوب و کاه نشان داد که افزودن بیوچار چوب و کاه به جیره‌های آزمایشی به ترتیب با ۷ درصد افزایش و ۱۱ درصد کاهش تولید گاز همراه بود (۱۴). گزارش شده است که افزودن ترکیبات کربنی به خوراک دام سبب بهبود فعالیت میکروبی و تخمیر شکمبه‌ای می‌شود و از این رو تولید گاز آزمایشگاهی افزایش می‌یابد (۲۶) اما در این مطالعه افزودن بیوچار پوست گردو و بستر مرغ نه تنها تولید گاز را افزایش نداد بلکه سبب کاهش گاز تولیدی نسبت به شاهد گردید. تفاوت بین نتایج آزمایشات مذکور و نتایج این تحقیق احتمالاً به دلیل نوع بیوچار و جیره پایه استفاده شده است زیرا بیوچار تخمیر شکمبه‌ای علوفه‌های باکیفیت پایین را بیشتر از علوفه‌های باکیفیت بالا بهبود می‌دهد، همچنین مساحت سطح ویژه تأمین‌شده توسط بیوچار بر جذب

می‌کند و از این رو باتوجه به نوع بیوجار کاربردی، تغییر در ویژگی‌های ساختاری آن می‌تواند بر میزان جذب گازها مؤثر باشد (۲۲).

سطحی آن و در نهایت بر مقدار گاز تولیدشده در شرایط آزمایشگاهی مؤثر است (۳۲). گزارش شده است ساختمان دارای منافذ ریز و سطح مقطع بالا در بیوجار نقش اساسی در فرآیند جذب گازها ایفا

جدول ۲: مقایسه میانگین گاز تولیدی (میلی لیتر در ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک) و فراسنجه‌های تولید گاز در جیره‌های آزمایشی.

Table 2. Means comparison of gas production (ml/200 mg DM) and gas production parameters in experimental diets

فراسنجه‌های تولید گاز Gas production parameters		تولید گاز (ساعت) Gas production (h)		سطوح (درصد) Levels (%)	تیمارها Treatments
c	b	96	24		
0.096 ^a	22.93 ^{ab}	29.22 ^a	26.36 ^a	-	شاهد Control
0.080 ^{dc}	19.32 ^c	26.08 ^{bc}	22.78 ^{cde}	0.5	بیوجار پوست گردو Walnut shell biochar
0.093 ^{ab}	22.26 ^{ab}	27.68 ^{ab}	24.97 ^{abc}	1	
0.086 ^{abcd}	20.74 ^{bc}	26.66 ^{bc}	23.69 ^{bcd}	1.5	
0.077 ^d	21.25 ^{abc}	25.40 ^c	21.32 ^e	0.5	بیوجار بستر مرغ Chicken manure biochar
0.092 ^{abc}	21.44 ^{abc}	25.33 ^c	22.46 ^{de}	1	
0.081 ^{bcd}	23.49 ^a	28.75 ^a	25.58 ^{ab}	1.5	انحراف استاندارد میانگین‌ها SEM
0.0036	0.689	0.654	0.695		سطح معنی داری P Value
0.0156	0.0132	0.0034	0.0014		بین تیمارها within treatments
0.0308	0.0202	0.0348	0.0264	بیوجار پوست گردو	بین سطوح within levels
0.0295	0.1611	0.0061	0.0054	بیوجار بستر مرغ	خطی Linear
0.2349	0.2579	0.0639	0.0906	بیوجار پوست گردو	
0.1100	0.5864	0.6452	0.7487	بیوجار بستر مرغ	درجه دوم Quadratic
0.1804	0.1540	0.1303	0.1281	بیوجار پوست گردو	درجه سوم Cubic
0.3448	0.0353	0.0008	0.0009	بیوجار بستر مرغ	
0.0106	0.0060	0.0316	0.0157	بیوجار پوست گردو	
0.0103	0.9958	0.9317	0.2679	بیوجار بستر مرغ	

میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P < 0.05$).

b: پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر / ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، c: نرخ تولید گاز (میلی لیتر بر ساعت)

Means within a column with different subscripts differ ($P < 0.05$).

b: Potential of gas production (ml/200mg DM), c= Rate constant of gas production during incubation (ml/h)

بیوجار در جیره آزمایشی اثر معنی داری بر قابلیت هضم ماده خشک جیره‌های آزمایشی محیط کشت نشان دادند ($P < 0.01$). قابلیت هضم ماده خشک جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح ۱ و ۰/۵ درصد از بیوجار پوست گردو نسبت به شاهد به ترتیب ۴۵/۳۶ و ۳۷/۵۸

فراسنجه‌های تخمیری: نتایج مربوط به تأثیر افزودن بیوجار پوست گردو و بستر مرغ به جیره‌های آزمایشی بر قابلیت هضم ماده خشک، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب زنجیر کوتاه در جدول ۳ نشان داده شده است. افزایش سطح

یافت؛ اما در این مطالعه بیوچارهای با ذرات ریز قابلیت هضم را بیشتر از بیوچارهای باذرات درشت افزایش دادند؛ آن‌ها بیان کردند که نوع و اندازه ذرات بیوچار با تأثیر بر مساحت سطح ویژه و درجه تخلخل فراهم‌شده در شکمبه اثر متقابل میکروارگانیسم‌ها و ذرات علوفه را تغییر می‌دهد (۳۲) به طوری که ذرات ریزتر بیوچار سطح ویژه بالاتری نسبت به ذرات درشت‌تر فراهم می‌کنند (۷). در این مطالعه قابلیت هضم ماده خشک با افزودن بیوچار پوست گردو و بستر مرغ به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به شاهد بیشتر بود. بر اساس تحقیقات انجام شده در محیط‌های هضم بی‌هوازی، در حضور بیوچار میکروارگانیسم‌ها یا در عمق خلل و فرج بیوچار یا در سطح آن مستقر می‌شوند و انواع میکروارگانیسم‌ها از این نظر باهم متفاوتند. از این رو ساختار بیوچار از نظر مساحت سطح ویژه و تراکم منافذ، بر استقرار و رشد گونه‌های خاصی از میکروارگانیسم‌ها مؤثر است و از این طریق فرآیندهای هضم و تخمیر در شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۳۰). مساعد شدن محل سکونت میکروبی در شکمبه با افزودن بیوچار، سبب رشد و توسعه بیوفیلم‌های حاوی جمعیت‌های مختلف میکروبی و ارتباط نزدیک‌تر باکتری‌ها در جهت تسهیل تبادل تولیدات نهایی بین آن‌ها می‌شود، که خود بهبود بازده انرژی و رشد میکروبی و در نهایت افزایش هضم و تخمیر خوراک را به دنبال دارد (۲۴ و ۲۶ و ۲۷). بر اساس مطالعات انجام شده سطح متخلخل بیوچارها قابلیت آن‌ها را در جذب گازها و مواد مغذی افزایش می‌دهد (۵)، به گونه‌ای که متراکم شدن مواد آلی در سطح آن‌ها محیطی مطلوب برای تجمع میکروارگانیسم‌های شکمبه فراهم می‌کند و از این رو سرعت تبدیل ترکیبات گیاهی به تولیدات نهایی افزایش می‌یابد (۱۷). گزارش شده است افزودن بیوچار به محیط‌های هضم بی‌هوازی طول فاز تاخیری را کاهش می‌دهد و سبب رشد سریع میکروارگانیسم‌ها

درصد افزایش ($p < 0.01$) و با سطح ۱/۵ درصد از بیوچار بستر مرغ نسبت به شاهد ۵۰/۹۰ درصد افزایش ($p < 0.05$) نشان داد. روند تغییرات قابلیت هضم ماده خشک با افزایش سطح بیوچار پوست گردو به صورت منحنی درجه دو ($p < 0.01$) و با افزایش سطح بیوچار بستر مرغ به صورت خطی ($p < 0.05$) تغییر کرد. مشابه با نتایج این آزمایش، گزارش شده است که افزودن بیوچار سبوس برنج (۰/۱۲ گرم در گرم ماده خشک جیره) سبب افزایش معنی‌داری در قابلیت هضم ماده خشک اندازه‌گیری شده در شرایط آزمایشگاهی گردید (۲۸). در تحقیقی افزودن ۵ درصد بیوچار سبوس برنج به جیره آزمایشی سبب افزایش قابلیت هضم ماده خشک گردید (۲۵) و یا استفاده از مایع شکمبه گاوهای دریافت‌کننده بیوچار (۰/۶۲ درصد ماده خشک مصرفی) اثر معنی‌داری بر افزایش قابلیت هضم ماده خشک نسبت به مایع شکمبه گاوهایی که بیوچار دریافت نکردند داشت (۲۷). در مقابل گزارش شده است که افزودن ۱ درصد بیوچار سبوس برنج به جیره بزهای بومی تأثیری بر قابلیت هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و پروتئین خام نسبت به جیره شاهد نداشت (۴۶). در بررسی اثر افزودن دو نوع بیوچار چوب و کاه (۹ درصد ماده خشک جیره) بر قابلیت هضم جیره به‌روش آزمایشگاهی اثر معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده خشک و دیواره سلولی مشاهده نشد (۱۴). در تحقیقی افزودن ۸۱ گرم به‌ازای هر کیلوگرم ماده خشک جیره پایه از بیوچارهای 'wp'، 'yp'، 'co' به‌همراه دو اندازه ریز ($< 178 \mu\text{m}$) و درشت ($> 178 \mu\text{m}$) ذرات بیوچارها به علوفه گراس اُرچارد، قابلیت هضم آزمایشگاهی با هر سه نوع بیوچار کاهش

-
- 1- White Pine
 - 2- Yellow Poplar
 - 3- Chestnut Oak

بستر مرغ در جیره آزمایشی غلظت نیتروژن آمونیاکی به صورت منحنی درجه سه ($P < 0/01$) تغییر کرد. نتایج حاصل از این آزمایش بایافته‌های حاصل از تحقیقات انجام شده بر روی دام زنده متفاوت است. در تحقیقی افزون ۰/۶ درصد بیوچار سبوس برنج به جیره گاوهای نر زبو سبب افزایش معنی‌داری در غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه گردید (۲۶)، همچنین باافزودن ۰/۳ درصد ترکیبات کربنی فعال شده به جیره بزها افزایش معنی‌داری در آمونیاک شکمبه آن‌ها گزارش شد (۱۲). در مقابل افزودن بیوچار سبوس برنج (۱ درصد ماده خشک جیره) به جیره بزهای بومی اثری بر غلظت آمونیاک شکمبه آن‌ها نداشت (۴۶). تجزیه ترکیبات نیتروژنی خوراک در شکمبه به وسیله پروتئازهای میکروبی، سبب تولید آمونیاک به عنوان فرآورده نهایی می‌گردد باوجود میزان پروتئین خام یکسان در جیره‌های آزمایشی، غلظت آمونیاک تولیدشده بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری داشت. غلظت آمونیاک (در شرایط آزمایشگاهی) برآیند تجزیه پروتئین و مصرف آمونیاک توسط برخی باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های سلولولایتیک است (۳۶).

تحقیقات نشان داده است که افزودن ترکیبات کربنی به محیط هضم بی‌هوازی، فعالیت و رشد میکروب‌های سلولایتیک را به واسطه مطلوب شدن جایگاه سکونت میکروبی افزایش می‌دهد (۱۹) بنابراین کاهش غلظت آمونیاک باافزودن بیوچار به جیره‌های آزمایشی در این مطالعه می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت و جمعیت باکتری‌های عمده مصرف‌کننده آن باشد. از طرفی ویژگی خاص ساختاری بیوچار می‌تواند در جذب آمونیاک تولید شده نقش داشته باشد، به طوری که کاهش مقدار آمونیاک در محیط‌های هضم بی‌هوازی با افزودن بیوچار را به جذب بالای آمونیاک در سطح بیوچار نسبت داده‌اند (۳۱ و ۴۷).

و افزایش قابلیت هضم می‌شود (۳۰ و ۳۵). این دلایل می‌توانند افزایش قابلیت هضم ماده خشک در این آزمایش را توجیه نمایند.

استفاده از سطوح مختلف بیوچار پوست گردو و بستر مرغ مشابه با تغییرات تولید گاز سبب کاهش انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب زنجیر کوتاه و قابلیت هضم ماده آلی در جیره‌های آزمایشی شد ($P < 0/01$). این فراسنجه‌ها با افزایش سطح بیوچار پوست گردو به صورت منحنی درجه سه و باافزایش سطح بیوچار بستر مرغ به صورت منحنی درجه دو تغییر کردند ($P < 0/01$). به طوری که بیشترین مقدار فراسنجه‌های مذکور مربوط به شاهد و سطح ۱ و ۱/۵ درصد به ترتیب از بیوچار پوست گردو و بستر مرغ بود. مقادیر گزارش شده انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب زنجیر کوتاه و قابلیت هضم ماده آلی توسط معادلات رگرسیونی بر اساس داده‌های حاصل از تولید گاز برآورد گردیدند، از این رو باکاهش تولید گاز در اثر افزودن بیوچار پوست گردو و بستر مرغ به جیره‌های آزمایشی این فراسنجه‌ها نیز به طور مشابه باروند تغییرات تولید گاز به طور معنی‌داری کاهش یافتند.

نیتروژن آمونیاکی و متان: نتایج حاصل از تأثیر افزودن سطوح مختلف بیوچار پوست گردو و بستر مرغ به جیره‌های آزمایشی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی و میزان انتشار متان در جدول ۴ نشان داده شده است. با افزایش سطح بیوچار پوست گردو و بستر مرغ در جیره‌های آزمایشی غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری ($P < 0/01$) نشان داد، به طوری که سطح ۱ درصد بیوچار پوست گردو و ۱/۵ درصد بیوچار بستر مرغ به ترتیب سبب ۴۳/۲۴ و ۴۸/۹۷ درصد کاهش در مقدار نیتروژن آمونیاکی نسبت به شاهد شدند. روند تغییرات در غلظت نیتروژن آمونیاکی باافزودن بیوچار پوست گردو به جیره آزمایشی به صورت خطی ($P < 0/01$) بود. باافزایش سطح بیوچار

جدول ۳: مقایسه میانگین انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب زنجیر کوتاه، قابلیت هضم ماده آلی و قابلیت هضم ماده خشک در جیره‌های آزمایشی.

Table 3. Means comparison of metabolizable energy (ME), short chain fatty acids (SCFA), organic matter digestibility (OMD) and dry matter digestibility (DDM) in experimental diets

اسیدهای چرب زنجیر کوتاه SCFA (mmol)	انرژی قابل متابولیسم ME (MJ/Kg DM)	قابلیت هضم ماده آلی OMD (%)	قابلیت هضم ماده خشک DMD (%)	سطوح (درصد) Levels (%)	تیمارها Treatments
0.58 ^a	5.29 ^a	44.62 ^a	50.92 ^{dc}	-	شاهد Control
0.50 ^{cde}	4.73 ^{cde}	41.40 ^{cde}	70.06 ^{ab}	0.5	بیوچار پوست گردو
0.55 ^{abc}	5.07 ^{abc}	43.30 ^{abc}	74.02 ^{ab}	1	Walnut shell biochar
0.52 ^{bcd}	4.87 ^{bcd}	42.11 ^{bcd}	47.96 ^d	1.5	
0.46 ^c	4.50 ^e	40.09 ^e	62.68 ^{bc}	0.5	بیوچار بستر مرغ
0.49 ^{de}	4.68 ^{ed}	41.07 ^{de}	51.60 ^{cd}	1	Chicken manure biochar
0.56 ^{ab}	5.16 ^a	43.80 ^{ab}	76.84 ^a	1.5	
0.015	0.109	0.618	3.984		انحراف استاندارد میانگین‌ها SEM
					سطح معنی‌داری P Value
0.0014	0.0014	0.0014	0.0034		بین تیمارها within treatments
0.0264	0.0261	0.0237	0.0080	بیوچار پوست گردو	بین سطوح within levels
0.0054	0.0054	0.0053	0.0505	بیوچار بستر مرغ	خطی linear
0.0906	0.0883	0.0701	0.7354	بیوچار پوست گردو	
0.7487	0.7383	0.6488	0.0348	بیوچار بستر مرغ	درجه دوم quadratic
0.1281	0.1279	0.1281	0.0017	بیوچار پوست گردو	درجه سوم cubic
0.0009	0.0009	0.0009	0.2286	بیوچار بستر مرغ	
0.0157	0.0157	0.0157	0.3358	بیوچار پوست گردو	
0.2679	0.2679	0.2669	0.0495	بیوچار بستر مرغ	

میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

Means within a column with different subscripts differ ($P < 0.05$).

بافزایش سطح بیوچار پوست گردو به صورت منحنی درجه دو ($P < 0.01$) و باافزایش سطح بیوچار بستر مرغ به صورت خطی ($P < 0.01$) تغییر کرد. بیشترین درصد کاهش متان نسبت به جیره شاهد مربوط به سطح یک درصد بیوچار پوست گردو و ۱/۵ درصد بیوچار بستر مرغ بود. نتایج تحقیقات زیادی در خصوص تأثیر استفاده از منابع مختلف بیوچار بر کاهش تولید متان در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی نتایج آزمایش اخیر را تأیید می‌کنند. برای مثال، استفاده از یک درصد بیوچار سبوس برنج تولید گاز متان را در شرایط آزمایشگاهی ۱۱ تا ۱۳ درصد

افزودن بیوچار سبب کاهش تولید گاز متان در اثر تخمیر جیره‌های آزمایشی گردید. با افزودن سطوح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد بیوچار به جیره‌های آزمایشی مقدار تولید متان به ترتیب ۲۵/۶۳، ۴۳/۸۲ و ۲۵/۸۱ درصد برای بیوچار پوست گردو و به ترتیب ۱۹/۲۸، ۲۴/۹۵ و ۳۸/۷۸ درصد برای بیوچار بستر مرغ نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ($P < 0.01$). روند تغییرات تولید متان باافزایش سطح بیوچار پوست گردو به صورت خطی و درجه دو ($P < 0.01$) بود. تولید متان باافزایش سطح بیوچار بستر مرغ از روند خطی پیروی کرد. درصد متان تولید شده

محیط کشت (۱/۵ درصد ماده خشک جیره آزمایشی) به همراه استفاده از مایع شکمبه گاوهای دریافت کننده بیوچار سبوس برنج (۰/۶۲ درصد ماده خشک جیره) سبب کاهش معنی داری در انتشار متان گردید (۲۷). در این آزمایش غلظت کمتر متان در گاز حاصل از تخمیر جیره پایه در مقایسه با تیمار شاهد را می توان به سطح ویژه بیوچار نسبت داد. به طور کلی، مهمترین اثر سودمند بیوچار را به کاهش انتشار متان در شکمبه مربوط دانسته اند (۲۸). کاهش انتشار متان توسط بیوچار به افزایش جمعیت متانوتروف ها در شکمبه دام های مصرف کننده بیوچار و استقرار نزدیک به هم جمعیت متانوژن ها و متانوتروف ها در سطح بیوچار نسبت داده اند (۱۶ و ۱۸ و ۴۳).

کاهش داد (۲۵) و یا گزارش شده است که افزودن ۰/۶ درصد از بیوچار سبوس برنج به جیره گاوهای زبو تولید متان را ۲۲ درصد نسبت به شاهد کاهش داد و این اثر بیوچار به خاصیت جذبی آن نسبت داده شد (۲۶). همچنین، افزودن یک درصد از بیوچار سبوس برنج به جیره بزهای بومی سبب کاهش معنی داری در نسبت تولید متان به دی کسید کربن گردید (۴۶). نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد ۰/۱۲ درصد از بیوچار سبوس برنج در شرایط آزمایشگاهی سبب کاهش معنی داری در تولید گاز متان شد (۲۸)، و یا اینکه افزودن ۹ درصد از بیوچار تولید شده از ضایعات چوب و کاه، تولید متان را در شرایط آزمایشگاهی ۱۱ تا ۱۷ درصد نسبت به شاهد کاهش داد (۱۴). تحقیقات آزمایشگاهی نشان داد افزودن بیوچار به

جدول ۴: مقایسه میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی و متان در جیره های آزمایشی.

Table 4. Means comparison of ammonia and methane in experimental diets.

تیمارها	سطوح (درصد)	نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم / دسی لیتر)	متان (میلی لیتر)	متان (درصد)	درصد کاهش متان نسبت به جیره شاهد
Treatments	Levels (%)	NH ₃ (mg/dl)	Methane (ml)	Methane (%)	
شاهد	-	15.67 ^a	15.03 ^a	57.08 ^a	-
بیوچار پوست گردو	0.5	14.79 ^a	11.17 ^b	49.02 ^b	14.12
Walnut shell biochar	1	7.99 ^b	8.44 ^c	33.77 ^c	40.82
	1.5	10.29 ^b	11.15 ^b	47.08 ^b	17.15
بیوچار بستر مرغ	0.5	10.96 ^b	12.13 ^b	56.92 ^a	0.26
Chicken manure biochar	1	15.05 ^a	11.28 ^b	50.16 ^b	12.11
	1.5	8.89 ^b	9.20 ^c	35.87 ^c	37.15
انحراف استاندارد میانگین ها		1.092	0.523	1.406	-
SEM					
P Value					
سطح معنی داری بین تیمارها		0.0001	<0.0001	<0.0001	
Within treatments					
بین سطوح	بیوچار پوست گردو	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
Within levels	بیوچار بستر مرغ	0.0108	0.0006	<0.0001	
خطی	بیوچار پوست گردو	<0.0001	0.0002	0.0001	
Linear	بیوچار بستر مرغ	0.0196	<0.0001	<0.0001	
درجه دوم	بیوچار پوست گردو	0.0128	0.0001	<0.0001	
Quadratic	بیوچار بستر مرغ	0.5995	0.4920	0.0014	
درجه سوم	بیوچار پوست گردو	<0.0001	0.0801	0.0005	
Cubic	بیوچار بستر مرغ	0.0083	0.2338	0.8925	

میانگین های با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<0.05).

Means within a column with different subscripts differ (P<0.05).

درصد بیوچار پوست گردو و ۱/۵ درصد از بیوچار بستر مرغ پتانسیل افزایش قابلیت هضم و بهبود شرایط تخمیر با کاهش انتشار متان و تولید آمونیاک را دارند. بنابراین استفاده از یک درصد بیوچار پوست گردو و یا ۱/۵ درصد از بیوچار بستر مرغ برای دستکاری تخمیر در شکمبه و کاهش تولید گاز متان پیشنهاد می‌شود.

سیاسگزارى

از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای همکاری در انجام آزمایشات تشکر و قدردانی می‌شود.

گزارش شده است در حضور بیوچار متانوژن‌های ساکن در سطح آن از طریق واکنش برگشتی $(\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O})$ بخشی از متان تولید شده را اکسید می‌کنند به طوری که در این واکنش سولفات به عنوان گیرنده نهایی الکترون عمل می‌کند (۱۶). مطالعات هانسن و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده است که در حضور بیوچار هضم دیواره سلولی باحداقل اتلاف انرژی به شکل متان انجام می‌شود. آن‌ها بیان کردند که خاصیت جذب گاز توسط بیوچار و مطلوب شدن محیط سکونت برای تجمع و رشد جمعیت میکروبی در سطح متخلخل بیوچار می‌تواند انتشار متان را کاهش دهد (۱۴).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج نشان داد استفاده از سطح یک

منابع

- Adams, A.D. 1976. Powdered activated carbon improves anaerobic digestion water sewage works. 123(7): 62-63.
- Banner, R.E., Rogosic, J., Burrirt, E.A., and Provenza, F.D. 2000. Supplemental barley and charcoal increase intake of sagebrush by lambs. J. Range Manage. 53: 415-420.
- Broderick, G.A., and Kang, J.H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. J. Dairy. Sci. 63: 64-75.
- Chen, X.B. 1995. "Fitcurve" macro, IFRU, The Macaulay Institute, Aberdeen, UK.
- Cheng, K.J., McAllister, T.A., and Costerton, J.W. 1995. Biofilm of the ruminant digestive tract. Pp: 221-232, In: H.M. Lappin-Scott and J.W. Costerton (eds), Microbial biofilms. The Cambridge University Press.
- Chu, G.M., Jung, C.K., Kim, H.Y., Ha, J.H., Kim, J.H., Jung, M.S., Lee, S.J., Song, Y., Ibrahim, R.I.H., Cho, J.H., Lee, S.S. and Song, Y.M. 2013. Effects of bamboo charcoal and bamboo vinegar as antibiotic alternative on growth performance, immune responses and fecal microflora population in fattening pigs. J. Anim. Sci. 84: 113-120.
- Cuetos, M.J., Martinez, E.J., Moreno, R., Gonzalez, R., Otero, M., and Gomez, X. 2017. Enhancing anaerobic digestion of poultry blood using activated carbon. J. Adv. Res.
- Day, D., Evans, R.J., Lee, J., and Reicosky, D. 2005. Economical CO₂, SO₄ and NO₂ capture from combined Renewable hydrogen production and large scale carbon sequestration. J. Energ. 30: 2558-2579.
- Demeyer, D., DeMeulemeester, M., DeGraeve, K., and Gupta, B.W. 1988. Effect of fungal treatment on nutritive value of straw. J. Med Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent. 53: 1811-1819.
- Downie, A., Crosky, A., and Munroe, P. 2009. Physical properties of biochar. P 1332. In: J. Lehmann and S. Joseph (eds). Biochar for environmental management: science and technology. Earthscan: London, UK.
- Fedorak, P.M., and Hurdy, D.E. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. J. Environ Tech. 4: 425-432.

12. Garillo, E.P., Pradhan, R., and Tobioka, H. 1994. Effects of activated charcoal on ruminal characteristics and blood profiles in mature goats. *J. Anim. Sci.* 35: 85-89.
13. Gerlach, H., Gerlach, A., Schrodler, W., Schottdorf, B., Haufe, S., Helm, H., Shehata, A., and Kruger, M. 2014. Oral application of charcoal and humic acids to dairy cows influences *Clostridium botulinum* blood serum antibody level and glyphosate excretion in urine. *J. Clin Toxicol.* 4: 186.
14. Hansen, H.H., Storm, I.M.L.D., and Sell, A.M. 2013. Effect of biochar on *in vitro* rumen methane production. *J. Anim. Sci.* 62(4): 305-309.
15. Johnson, K.A., and Johnson, D.E. 1995. Methane emission from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483-2492.
16. Kajikawa, H., Valdes, C.K., Hillman, K., Wallace, R.J., and Newbold, C.J. 2003. Methane oxidation and its coupled electron-sink reactions in ruminal fluid. *J. Appl Microbiol.* 36: 6, 354-357.
17. Keshav, C.D. 2011. Biochars, methods of using biochars, methods of making biochars, and reactors. US Patent WO/2011/019871.
18. Knittel, K., and Boetius, A. 2009. Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *J. Annu Rev. Microbiol.* 63: 311-344.
19. Kumar, S., Jain, M.C., and Chhonkar, P.K. 1987. A note on stimulation of biogas production from cattle dung by addition of charcoal. *J. Biol. Wastes.* 20: 209-215.
20. Lehmann, J. 2007a. A handful of carbon. *Nature.* 47: 143-144.
21. Lehmann, J. 2007b. Bio-energy in the black. *J. Front Ecol. Environ.* 5: 381-387.
22. Lehmann, J., and Joseph, S. 2009. Biochar for Environmental Management: Science and Technology. p 1-12, In: J. Lehmann and S. Joseph (eds), *Biochar for Environmental Management. Science and Technology.* London: Earthscan.
23. Lehmann, J., Skjemstad, J., Sohi, S., Carter, J., Barson, M., Falloon, P., Coleman, K., Woodbury, P., and Krull, E. 2008. Australian climate-carbon cycle feedback reduced by soil black carbon. *Nat Geosci.* 1: 832-835.
24. Leng, R.A. 2014. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *J. Anim Prod. Sci.* 54: 519-543.
25. Leng, R.A., Inthapanya, S., and Preston, T.R. 2012. Biochar lowers net methane production from rumen fluid *in vitro*. *Livestock Research for Rural Development.* 24: 6.
26. Leng, R.A., Preston, T.R., and Inthapanya, S. 2012. Biochar reduces enteric methane and improves growth and feed conversion in local "Yellow" cattle fed cassava root chips and fresh cassava foliage. *Livestock Research for Rural Development.* 24: 11.
27. Leng, R.A., Preston, T.R., and Inthapanya, S. 2012. Methane production is reduced in an *in vitro* incubation when the rumen fluid is taken from cattle that previously received biochar in their diet. *Livestock Research for Rural Development.* 24: 211.
28. Leng, R.A., Inthapanya, S., and Preston, T.R. 2013. All biochars are not equal in lowering methane production in *in vitro* rumen incubations. *Livestock Research for Rural Development.* 25: 106.
29. Liu, F., Rotaru, A., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. 2012. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *J. Energ Environ. Sci.* 5: 8982-8989.
30. Luo, C., Lü, F., Shao, L., and He, P. 2015. Application of eco-compatible biochar in anaerobic digestion to relieve acid stress and promote the selective colonization of functional microbes. *J. Water Res.* 68: 710-718.
31. Malinskaa, K., Świątek, M.Z., and Dach, J. 2014. Effects of biochar amendment on ammonia emission during composting of sewage sludge. *J. Ecol. Eng.* 71: 474-478.
32. McFarlane, Z.D., Myer, P.R., Cope, E.R., Evans, N.D., Bone, T.C., Biss, B.E., and Mulliniks, J.T. 2017. Effect of biochar type and size on *in vitro* rumen fermentation of orchard grass hay. *J. Agric. Sci.* 8: 316-325.
33. Menke, K.H., and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *J. Anim. Res Dev.* 28: 7-55.

34. Mitsumori, M., Ajisaka, N., Tajima, K., Kajikawa, H., and Kurihara, M. 2002. Detection of Proteobacteria from the rumen by PCR using methanotroph-specific primers. *J. Lett Appl. Microbiol.* 35: 3,251-255.
35. Mumme, J., Srocke, F., Heeg, K., and Werner, M. 2014. Use of biochars in anaerobic digestion. *J. Bioresour. Technol.* 164: 189-197.
36. Nolan, J.V., and Dobos, R.C. 2005. Nitrogen transactions in ruminants. P 177-206, In: J. Dijkstra, J.M. Forbes and J. France (eds), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. CABI Publishing, Walingford, UK.
37. NRC. 2007. *Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids*. National Academy Press. 384p.
38. Ogino, A., Orito, H., Shimada, K., and Hirook, H. 2007. Evaluating environmental impacts of the Japanese beef cow-calf system by the life cycle assessment method. *J. Anim. Sci.* 78: 424-432.
39. Ørskov, E.R., and McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agri. Sci.* 92: 499-503.
40. Patra, A.K., and Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *J. Microbiol.* 96: 363-375.
41. Pereira, C., Muetzel, R., Camps, S., Arbestain, M., Bishop, P., Hina, K., and Hedley, M. 2014. Assessment of the influence of biochar on rumen and silage fermentation: A laboratory-scale experiment. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 196: 220-231.
42. Prasai, T.P., Walsh, K.B., Bhattarai, S.P., Midmore, D.J., Van, T.T.H., Moore, R.J., and Stanley, D. 2016. Biochar, bentonite and zeolite supplemented feeding of layer chickens alters intestinal microbiota and reduces campylobacter Load. *J. PLoS One.* 11: 4,1-13.
43. Sadasivam, B.Y., and Reddy, K.R. 2015. Adsorption and transport of methane in biochars derived from wastewood. *J. Waste Manage.* 1-12.
44. SAS, 2003. *SAS User's Guide Statistics*. Version 9.1 Edition. SAS Inst., Cary, NC.
45. Shakeri, P., Aghashahi, A.R., Mostafavi, H., and Mirzaee, M. 2014. Effects of ensiling Pistachio by-products on ruminal fermentation and methane emission mitigation using invitro batch fermentation. *J. Anim. Sci.*, (Pajouhesh and sazandegi). 106: 43-54. (In Persian)
46. Silivong, P., and Preston, T.R. 2015. Growth performance of goats was improved when a basal diet of foliage of *Bauhinia acuminata* was supplemented with water spinach and biochar. *Livestock Research for Rural Development.* 27: 3.
47. Steiner, S., Das, K.C., Melear, N., and Lakly, D. 2010. Reducing nitrogen loss during poultry litter composting using biochar. *J. Environ Qual.* 39: 1236-1242.
48. Stocks, P.K., and McCleskey, C.S. 1964. Morphology and physiology of *Methanomonas methanooxidans*. *J. Bacteriol.* 88: 1071-1077.
49. Toth, J.D., and Dou, Z. 2016. Use and impact of biochar and charcoal in animal production systems. P 199-224, In: M. Guo, Z. He and M. Uchimiya (eds), *Agricultural and Environmental Applications of Biochar: Advances and Barriers*, Soil Science Society of America, Inc., Madison.
50. Van, D.T.T., Nguyen, T.M., and Ledin, I. 2006. Effect of method of processing foliage of *Acacia mangium* and inclusion of bamboo charcoal in the diet on performance of growing goats. *J. Anim. Feed Sci. Tech.* 130: 242-256.
51. Villalba, J.J., Provenza, F.D., and Banner, R.E. 2002. Influence of macronutrients and activated charcoal on intake of sagebrush by sheep and goats. *J. Anim. Sci.* 80: 2099-2109.
52. Yang, X.B., Ying, G.G., Peng, P.A., Wang L., Zhao, J.L., Zhang, L.J., Yuan, P., and He, H.P. 2010. Influence of biochars on plant uptake and dissipation of two pesticides in an agricultural soil. *J. Agric. Food Chem.* 58: 7915-7921.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Ruminant Research, Vol. 6(1), 2018
<http://ejrr.gau.ac.ir>

Effect of different levels of walnut shell and chicken manure biochar on ruminal fermentation parameters and methane production

*A. Mirheidari¹, N.M. Torbatinejad², S. Hassani² and P. Shakeri³

¹Ph.D. Graduated and ²Professor, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

³Animal Sciences Research, Dept. of Kerman Agricultural and Natural Resource Research and Education Center, Kerman, Iran

Received: 04/30/2017; Accepted: 08/07/2017

Abstract

Background and objectives: Biochar is a carbonaceous material obtained when burning agriculture and animal biomass in a closed container with little or no available oxygen. Biochar combines a porous structure and large surface area that create habitat for establishment and development of biofilm residing microbes in anaerobic environments including rumen and increased microbial growth, reproduction and improved efficiency of fermentative digestion. Highly porous structure of biochar such as methanotrophes (methane oxidants) facilitates the formation of microbial colonies. Methane oxidation, archae and methanotrophic consortia on to the surfaces of the biochar increase as well as their population. The objective of this study was to determine effect of different levels walnut shell and chicken manure biochar on gas production, digestibility, methane, and ammonia production in an *in vitro* batch fermentation system.

Materials and methods: Sun-dried walnut shell and chicken manure heated in a closed container with little available oxygen. Levels of 0.5, 1 and 1.5% of each biochar were added to the experimental diet including alfalfa, wheat straw, barley grain, corn grain, soybean meal, vitamin and mineral supplement and salt with ratio 60% forage to 40% concentrate. The study was carried out in a completely randomized design with seven treatments: 1- Control, without biochar; 2- basal diet+ 0.5% walnut shell biochar; 3- basal diet+ 1% walnut shell biochar; 4- basal diet+ 1.5% walnut shell biochar; 5- basal diet+ 0.5% chicken manure biochar; 6- basal diet+ 1% chicken manure biochar; and 7- basal diet+ 1.5% chicken manure biochar. All samples were incubated with three replications using buffered rumen fluid obtained from four Kermanian sheep (two years old and 50.5 kg weight) for 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 hrs. At the end of 24 hrs of incubation gas production, dry matter digestibility, concentrations of ammonia and methane was measured and gas production parameters, metabolizable energy, short chain fatty acids and organic matter digestibility were estimated.

Results: The result showed that the gas production decreased ($P<0.01$) by addition of biochar to diets after 24 and 96 hrs of incubation, but the level of 1% of walnut shell biochar and 1.5% of chicken manure biochar had minimal impact on gas production. Means of metabolizable energy, short chain fatty acids and digestibility of organic matter at the level 1% of walnut shell biochar and 1.5% chicken manure biochar were not different from control. Digestibility of dry matter *in vitro* increased at the 1% level of walnut shell biochar ($p<0.01$) and 1.5% of chicken manure biochar ($p<0.01$). Addition of 1% walnut shell biochar and 1.5% chicken manure biochar decreased ammonia-N concentrations, methane and methane production compared to control.

Conclusion: In general, these findings indicated that the 1% walnut shell biochar and 1.5% chicken manure had a potential to decrease methane mitigation and ammonia concentrations. Therefore, they can be new alternatives for modifying of rumen fermentation.

Keywords: Biochar, Methane, Biomass, Digestibility, Ammonia

*Corresponding author; az_mirhidar@yahoo.com