نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۳، تابستان ۱۳۹۸
ص‌ص: ۱۲۷~۱۳۸

تاثیر سطوح مختلف بیوچار حاصل از محصول فرعی پسته بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه، جمعیت پروتوزوآیی و تولید متان به‌روش برون تنی

- **اعظم میرحیدری**
دانش آموخته دوره دکتری علوم دامی، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- **نورمحمد تربتی نژاد**
استاد گروه علوم دامی، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- **پیروز شاکری**(نویسنده مسئول)
دانشیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۳۴۱۶۴۱۹
Email: Pirouz_shakeri@yahoo.co.uk

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.122035.1708

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی اثر سطوح مختلف بیوچار حاصل از محصول فرعی پسته بر میزان تولید گاز، قابلیت هضم، تولید متان، آمونیاک و اسیدهای چرب فرار به‌روش آزمایشگاهی انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار اجرا گردید. سطوح صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد بیوچار محصول فرعی پسته در جیره غذایی بره‌های پرواری حاوی ٤٠ درصد علوفه و ٦٠ درصد کنسانتره استفاده شد. انکوباسیون با استفاده از مایع شکمبه چهار رأس گوسفند کرمانی فیستوله شده انجام شد. افزودن بیوچار به جیره‌های آزمایشی اثر معنی‌داری بر تولید گاز در زمان ٢٤ و ٩٦ ساعت انکوباسیون، فراسنجه‌های تولید گاز، جمعیت پروتوزوآ و اسیدهای چرب فرار نداشت. استفاده از بیوچار محصول فرعی پسته سبب افزایش pH نسبت به جیره شاهد شد ($P<0/01$). غلظت نیتروژن آمونیاکی ($P<0/05$) و مقدار و درصد متان ($P<0/01$) با افزودن سطوح ۱ و ۱/۵ درصد بیوچار محصول فرعی پسته به جیره پایه در مقایسه با شاهد کاهش یافت. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از بیوچار محصول فرعی پسته می‌تواند باعث کاهش تولید متان و آمونیاک و بهبود بازده تخمیر شکمبه شود.

واژه‌های کلیدی: بیوچار، محصول فرعی پسته، متان، آمونیاک، **pH**

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 123 pp: 127-138

Effect of different levels of pistachio by-product biochar on ruminal fermentation parameters, protozoa population and methane production by in vitro method

By: Azam Mirheidari[1], Noor Mohammad Torbatinejad[2], Pirouz Shakeri[3]*
1 Former Ph. D. Student, Department of Animal Nutrition, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2 Professor, Department of Animal Nutrition, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3 Associated Professor, Animal Science Research Department, Kerman Agricultural and Natural Resource Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran
*Corresponding Author: Pirouz Shakeri, Pirouz_shakeri@yahoo.co.uk

Received: June 2018 **Accepted: August 2018**

This study was carried out to investigate the effects of different levels of pistachio by-product biochar (PBPB) on cumulative gas production, gas production parameters, short chain fatty acids, digestibility, methane and ammonia production and volatile fatty acids in an in vitro batch fermentation system. The study was carried out in a completely randomized design with four treatments and three replications. Four levels of PBPB including 0, 0.5, 1 and 1.5 % were added to the experimental diets with ratio 60% forage to 40% concentrate. All samples were incubated in three replications using buffered ruminal fluid collected from 4 Kermanian sheep. Result indicated that inclusion of biochar to experimental diet had no significant effect on cumulative gas production after 24 and 96 h of incubation, short chain fatty acids, protozoa population and volatile fatty acids. Inclusion of PBPB to the diet significantly increased pH ($P<0.01$) compared to control treatment . Concentrations of ammonia ($P<0.05$) and methane ($P<0.01$) significantly decreased at 1 and 1.5% of PBPB compared to control. In general, these findings indicated that the use of PBPB can reduce methane mitigation and ammonia concentrations and improve ruminal fermentation.

Key words: Biochar, Pistachio by-product, Methane, Ammonia, pH.

مقدمه

نشخوارکنندگان ۷۰ درصد از کل پروتئین دامی قابل‌مصرف انسان را تأمین می‌کنند. این حیوانات برای هضم خوراک متکی به تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه هستند که حدوداً ۸۰ درصد از انرژی (France وSiddons ، ۱۹۹۳) و ۶۰ تا ۸۵ درصد از پروتئین (Ørskov، ۱۹۸۲) مورد نیاز حیوان از این طریق تأمین می‌شود. اما این روند به دلیل اتلاف بخشی از انرژی خوراک (۲ تا ۱۲ درصد از انرژی خام) به‌صورت متان (Johnson و Johnson، ۱۹۹۵) و نیتروژن (۷۵ تا ۸۵ درصد) به‌صورت آمونیاک (Tamminga، ۱۹۹۲) بازده مطلوبی ندارد و کاهش عملکرد تولیدی حیوان و آلودگی‌های زیست‌محیطی را در پی دارد (Morgavi و همکاران، ۲۰۱۰). بر این اساس، متخصصین تغذیه دام با هدف به‌حداقل رساندن اتلاف مواد مغذی در شکمبه به‌دنبال دستکاری اکوسیستم میکروبی شکمبه با استفاده از افزودنی‌های خوراکی می‌باشند (Shakeri و همکاران، ۲۰۱۷). در چند دهه گذشته، تعدادی افزودنی‌های خوراکی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، یونوفرها، مهارکننده‌های تولید متان و مواد ضد پروتوزوآ برای کاهش اتلاف انرژی و نیتروژن در شکمبه مورد استفاده قرارگرفته‌اند، اما به‌واسطه نگرانی‌هایی که در رابطه با وجود بقایای این مواد در محصولات دامی و افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد و به این دلیل استفاده از آن‌ها

در اروپا ممنوع شده است (Patra و Saxena، ۲۰۰۹). اخیراً تحقیقات نشان داده است که ترکیبات کربنی می‌توانند جایگزین مناسبی برای برخی از افزودنی‌های خوراکی ازجمله آنتی‌بیوتیک‌ها باشند (Chu و همکاران، ۲۰۱۳؛ Prasai و همکاران، ۲۰۱۶). از این‌رو تأثیر ترکیبات کربنی مانند بیوچار[1] بر روند تخمیر در شکمبه مورد توجه قرار گرفته‌اند (Gerlach و Schmidt، ۲۰۱۲). بیوچار ماده‌ای سیاه رنگ، متخلخل و دارای نواحی سطحی وسیع است که از کربنه شدن ناقص زیست‌توده‌های مختلف کشاورزی و دامی تولید می‌شود (Ahmad و همکاران، ۲۰۱۴). یکی از ویژگی‌های بیوچار قابلیت جذب بالای آن است که به ساختار آروماتیکی، گروه‌های عاملی با بار منفی و ترکیبات معدنی در سطح بیوچار نسبت داده شده است (Bopp و همکاران، ۲۰۱۶). افزودن بیوچار به جیره حیوانات نشخوارکننده نواحی سطحی وسیع و قابل دسترسی برای توسعه بیوفیلم حاوی جمعیت‌های مختلف میکروبی در شکمبه فراهم می‌کند که علاوه بر این‌که با تسهیل تبادل تولیدات تخمیری بین میکروارگانیسم‌های سینتروفیسم[2] (باکتری‌های وابسته به یکدیگر از نظر تولیدات متابولیکی) زمینه برای فعالیت و رشد میکروبی مهیا می‌شود (Leng و همکاران، ۲۰۱۲a,b,c) با ایجاد جایگاه مناسب و مطلوب، جمعیت متانوتروف‌ها (اکسید کننده‌های متان) افزایش و تقویت می‌شود. با استقرار جمعیت متانوژن‌ها و متانوتروف‌ها نزدیک به هم در سطح بیوچار انتقال متان از متانوژن‌ها به سمت متانوتروف‌ها تسهیل می‌شود و در نتیجه اکسیداسیون متان بهبود می‌یابد (Lehmann، ۲۰۰۷؛ Steiner و همکاران، ۲۰۱۰). در تحقیقی استفاده از مایع شکمبه گاوهای مصرف کننده بیوچار سبوس برنج (۰/۶۲ درصد ماده خشک جیره) در طی انکوباسیون آزمایشگاهی به‌همراه افزودن بیوچار (۱/۵ درصد ماده خشک) به جیره آزمایشی سبب بهبود معنی‌داری در تخمیر شکمبه و کاهش انتشار متان گردید (Leng و همکاران، ۲۰۱۲c)، همچنین بهبود بازده تبدیل خوراک با افزودن ۰/۶ درصد بیوچار سبوس برنج به جیره گاوهای نر نژاد زبو به کاهش ۲۲ درصدی تولید متان نسبت داده شد (Leng و همکاران، ۲۰۱۲b). در تحقیقی دیگر با افزودن ۱۰ و ۱۰۰ گرم بیوچار به ازای کیلوگرم ماده خشک جیره آزمایشی به محیط کشت، مقدار گاز تولیدی، متان و آمونیاک نسبت به شاهد کاهش یافت، اما مقدار اسیدهای چرب فرار تحت تأثیر افزودن بیوچار قرار نگرفت (Cabeza و همکاران، ۲۰۱۸). بهبود قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و پروتئین خام و همچنین افزایش ابقاء نیتروژن در اثر استفاده از ۰/۵ و ۱ گرم بیوچار به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در جیره بزها گزارش شده است (Van و همکاران، ۲۰۰۶). بر اساس مطالعات انجام شده ویژگی خاص ساختاری بیوچار می‌تواند در جذب آمونیاک (Seredych و Bandosz، ۲۰۰۷) و متان تولیدشده (Hansen و همکاران، ۲۰۱۳) در محیط‌های هضم بی‌هوازی مؤثر باشد. اطلاعات کمی در مورد اثرات بیوچار بر اکوسیستم میکروبی محیط شکمبه وجود دارد. بنابراین مطالعه حاضر به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف بیوچار تولیدشده از محصول فرعی پسته بر فراسنجه‌های تخمیری شامل تولید گاز، نیتروژن آمونیاکی، متان و قابلیت هضم در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تولید بیوچار

محصول فرعی پسته از یک پایانه فرآوری پسته در شهرستان سیرجان تهیه گردید و پس از خشک شدن در داخل حلب‌های کوچک دردار قرار داده شد. حلب‌های حاوی محصول فرعی پسته، داخل بشکه بزرگ‌تری بامنافذی 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 بوسیله دماسنج اندازه‌گیری و بوسیله 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 با پاشش آب روی آن‌ها سرد شدند و در برابر آفتاب خشک گردیدند (Odesola و Owoseni، ۲۰۱۰).

اندازه‌گیری میزان تولید گاز

به‌منظور تعیین تأثیر استفاده از سطوح مختلف بیوچار محصول فرعی پسته بر تخمیرپذیری جیره از روش تولید گاز استفاده شد. ابتدا یک جیره (جدول ۱) بر اساس احتیاجات بره‌های پرواری (NRC, ۲۰۰۷) با ۴۰ درصد علوفه و ۶۰ درصد کنسانتره تنظیم شد و نسبت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد از بیوچار محصول فرعی پسته به آن افزوده شد و با آسیاب مجهز به غربال ۱ میلی‌متری آسیاب شدند. مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم از هر جیره آزمایشی با ۶ تکرار (۳ تکرار برای اندازه‌گیری تولید گاز، ۳ تکرار برای اندازه‌گیری تولید متان) در داخل شیشه‌های سرم ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. مایع شکمبه ۲ ساعت بعد از وعده خوراک صبح از ۴ رأس گوسفند کرمانی مجهز به فیستولای شکمبه‌ای، هم‌سن (۲ساله)، با میانگین وزن ۵۰/۵ کیلوگرم که به‌صورت گروهی تغذیه می‌شدند اخذ گردید. این گوسفندان با جیره 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 درب‌دار به آزمایشگاه منتقل شد و با ۴ لایه پارچه متقال و در معرض گاز دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد صاف شد. مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مایع شکمبه بافری شده با محلول بافر (Menke و Steingass، ۱۹۸۸) 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 پرس گردید. پس از قرار دادن شیشه‌ها در انکوباتور شیکردار (سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد) میزان گاز تولیدی در ساعات ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ پس‌از انکوباسیون به روش Fedorak و Hurdy (۱۹۸۳) تعیین شد. حجم گاز تولیدی در هر زمان بر اساس ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک نمونه تصحیح گردید.

محاسبه فراسنجه‌های تخمیرپذیری

برای تخمین فراسنجه‌های کینتیک تولید گاز از معادله $P=b\ (1-e^{-ct})$ استفاده شد (Ørskov و McDonald، ۱۹۷۹) که در آن P: میزان گاز تولید شده در زمان t؛ b: پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر)؛ c: ثابت نرخ تولید گاز از بخش نامحلول (میلی‌لیتر در ساعت) و t: زمان انکوباسیون (ساعت) می‌باشد، که با استفاده از نرم افزار Fitcurve محاسبه شد. هم‌چنین از روابط زیر برای برآورد انرژی قابل سوخت و ساز، قابلیت هضم ماده آلی (Menke و Steingass، ۱۹۸۸) و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (Getachew و همکاران، ۲۰۰۲) استفاده شد.

رابطه (۱):

$$\text{انرژی قابل متابولیسم (MJ/kg DM)} = ۱/۰۶ + ۰/۱۵۷\times GP + ۰/۰۰۸۴ \times CP + ۰/۰۲۲EE - ۰/۰۰۸۱ \times XA$$

رابطه (۲):

$$\text{قابلیت هضم ماده آلی (\%)} = ۱۴/۸۸ + ۰/۸۸۹\times GP + ۰/۰۴۵\times CP + ۰/۰۶۵۱\times XA$$

رابطه (۳):

$$\text{اسیدهای چرب شاخه‌دار کوتاه زنجیر (mmol/۲۰۰mg DM)} = ۰/۰۲۲۲GP - ۰/۰۰۴۲۵$$

GP= گاز تولید شده از ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه پس از ۲۴ ساعت، CP= پروتئین خام (گرم در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک)، EE = چربی خام (گرم در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک) و XA= خاکستر (گرم در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک) در نمونه ماده خوراکی می‌باشد.

جدول ۱-اجزای تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی (درصد در ماده خشک)

اجزای جیره (درصد)	تیمارها			
	شاهد	بیوچار محصول فرعی پسته		
سطح بیوچار	۰	۰/۵	۱/۰	۱/۵
یونجه	۳۰/۰	۳۰/۰	۳۰/۰	۳۰/۰
کاه گندم	۹/۸	۹/۸	۹/۸	۹/۸
سبوس گندم	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷
دانه جو	۴۹/۴	۴۹/۰	۴۸/۶	۴۸/۲
دانه ذرت	۴/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰
کنجاله سویا	۳/۹	۳/۸	۳/۷	۳/۶
مکمل معدنی و ویتامینی[۱]	۱/۰	۱/۰	۱/۰	۱/۰
نمک	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
	ترکیبات شیمیایی (درصد)[۲]			
ماده خشک	۹۱/۴۶	۹۱/۰۰	۹۰/۵۴	۹۰/۰۸
پروتئین خام	۱۳/۱۵	۱۳/۰۵	۱۲/۹۶	۱۲/۸۷
کلسیم	۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۴۲
فسفر	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۳۱
انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری در کیلوگرم)	۲/۵۵	۲/۵۳	۲/۵۲	۲/۵۰

[۱] در هر کیلوگرم جیره: ۹۹/۲ میلی‌گرم منگنز، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۸۴/۷ میلی‌گرم روی، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۱ میلی‌گرم ید، ۰/۲ میلی‌گرم 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)

اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون نمونه‌ها، pH محتویات شیشه‌ها پس از صاف شدن با استفاده از pH متر (pH Meter CG 804, SCHOTT GERATE) تعیین شد.

غلظت نیتروژن آمونیاکی در مایع انکوباسیون پس از ۲۴ ساعت باروش فنل- هیپوکلریت تعیین شد (Broderick و Kang، ۱۹۸۰). برای اندازه‌گیری مقدار متان تولید شده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ۴ میلی‌لیتر سود (۱۰ مولار) به‌محتویات هر یک از شیشه‌ها اضافه گردید. سود سبب جذب گاز دی‌اکسید کربن می‌شود و گاز باقی‌مانده به‌عنوان متان اندازه‌گیری گردید (Demeyer و همکاران، ۱۹۸۸).

همچنین پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، از محتویات اسیدی شده

شیشه‌ها با اسید متافسفریک ۲۵ برای تعیین غلظت اسیدهای چرب فرار استفاده شد. نمونه‌های برداشت‌شده از شیشه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور دردقیقه سانتریفیوژ شدند و ۰/۲ میکرولیتر از این محلول به دستگاه گازکروماتوگرافی (Philips-PU4410, UK) تزریق گردید (Tabaru و همکاران، ۱۹۸۸). برای شمارش پروتوزوآ ۱ میلی‌لیتر از مایع شکمبه صاف شده به ۹ میلی‌لیتر فرمالدئید ۴ درصد افزوده شد و پس از رنگ آمیزی با رنگ متیلن بلو، بریلیانت گرین و لوگول در دمای اتاق قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ و لام نئوبار تعداد پروتوزوآ در هر میلی‌لیتر از مایع شکمبه شمارش شد (Dehority، ۱۹۸۴).

تجزیه آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از این آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار با استفاده از برنامه آماری SAS ویرایش ۹/۱ و رویه GLM تجزیه آماری شدند. برای تجزیه داده‌ها از مدل آماری (۱) استفاده گردید. میانگین‌ها باآزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. از چند جمله‌ای‌های متعامد (خطی و درجه دوم) برای بررسی روند تغییرات تولید گاز و فراسنجه‌های تولید گاز با افزایش سطح بیوچار در جیره‌ها استفاده شد (SAS, ۲۰۰۳).

مدل (۱)

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

که در این مدل: y_{ij}= مقدار هر مشاهده، μ= میانگین کل، T_i= اثر تیمار و ε_{ij}= اثر خطای آزمایشی می‌باشند.

نتایج و بحث

میزان تولید گاز و فراسنجه‌های آن

نتایج مربوط به‌تأثیر افزودن سطوح مختلف بیوچار محصول فرعی پسته به جیره‌ها بر گاز تولیدی حاصل از تخمیر پس از ۲۴ و ۹۶ ساعت انکوباسیون و سایر فراسنجه‌های تخمیری در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد افزایش سطح بیوچار در جیره‌های آزمایشی تأثیری بر مقدار گاز تولید شده، پتانسیل تولید گاز (b) و نرخ تولید گاز (c) در هر ساعت نداشت. مشابه با نتایج این آزمایش، گزارش شده است افزودن ۵ درصد بیوچار سبوس برنج به ریشه کاساوا اثری بر مقدار تولید گاز نداشت (Leng و همکاران، ۲۰۱۲a). در مطالعه دیگری افزودن بیوچار حاصل از علوفه ذرت و چوب صنوبر به علوفه ری‌گراس خشک و سیلوشده تأثیری بر میزان تخمیرپذیری و تولید گاز نداشت (Pereira و همکاران، ۲۰۱۴). برخی از مطالعات نیز متفاوت با نتایج ما، افزایش معنی‌داری در تولید گاز با افزودن بیوچارهای چوب درخت بلوط، چوب درخت لاله زینتی و چوب کاج سفید (۸۱ گرم در کیلوگرم ماده خشک) به جیره پایه (علوفه گراس اُرچارد) مشاهده کردند (McFarlane و همکاران، ۲۰۱۷). 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 نکرده بودند نیز نشان داد، تولید گاز با مایع شکمبه گاوهای مصرف‌کننده بیوچار بیشتر 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 به‌همراه ۱/۵ درصد از بیوچار سبوس برنج با استفاده از مایع شکمبه گاوهای مصرف‌کننده بیوچار، سبب افزایش معنی‌داری در تولید گاز نسبت به گروه شاهد گردید در این تحقیق علت افزایش تولید گاز به پویایی و فعالیت بیشتر جمعیت میکروبی در حضور بیوچار نسبت داده شد (Leng و همکاران، ۲۰۱۲c). نتایج متفاوت آزمایشات مذکور احتمالاً به دلیل نوع بیوچار و جیره پایه مورد استفاده است، زیرا بیوچار تخمیر شکمبه‌ای را با علوفه‌های کم‌کیفیت بیش از علوفه‌های باکیفیت بیشتر بهبود می‌دهد. علاوه بر این مقدار و نوع بیوچار به‌دلیل سطح ویژه تأمین‌شده و تعداد مکان‌های قابل دسترس جاذب بر جذب سطحی و در نهایت بر مقدار تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی مؤثر هستند (McFarlane و همکاران، ۲۰۱۷). در این تحقیق علت عدم تفاوت گاز تولیدی با افزودن بیوچارمحصول فرعی پسته نسبت به شاهد می‌تواند به نوع بیوچار مورد استفاده و تغییر در ویژگی‌های ساختاری آن مربوط باشد.

استفاده از سطوح مختلف بیوچار محصول فرعی پسته مشابه باتغییرات تولید گاز، تأثیر معنی‌داری بر انرژی قابل‌متابولیسم، اسیدهای چرب زنجیر کوتاه و قابلیت هضم ماده آلی نداشت. از آن‌جا که این مقادیر با استفاده از معادلات رگرسیونی از روی داده‌های تولید گاز برآورد گردیدند، از این‌رو عدم تفاوت در مقدار گاز تولیدی نسبت به شاهد با افزودن بیوچار محصول فرعی پسته به جیره‌های آزمایشی، این فراسنجه‌ها نیز تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشتند.

جدول۲- اثر سطوح مختلف بیوچار محصول فرعی پسته در جیره‌های آزمایشی بر میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) و فراسنجه‌های آن

متغیرها		شاهد	بیوچار محصول فرعی پسته			SEM	P-value		
		۰	۰/۵	۱/۰	۱/۵		تیمار	خطی	درجه دو
تولید گاز (ساعت)	۲۴	۲۶/۳۶	۲۶/۱۴	۲۵/۵۶	۲۶/۵۲	۰/۹۲۵	۰/۸۹	۰/۹۸	۰/۵۴
	۹۶	۲۹/۲۲	۲۸/۵۳	۲۷/۶۲	۲۹/۵۴	۰/۹۶۵	۰/۵۴	۰/۹۹	۰/۲۱
فراسنجه‌های تولیدگاز	b	۲۲/۹۳	۲۳/۶۵	۲۳/۳۸	۲۴/۶۳	۰/۹۹۳	۰/۶۸	۰/۳۱	۰/۷۹
	c	۰/۰۹۶	۰/۰۹۰	۰/۰۸۳	۰/۰۹۱	۰/۰۰۵	۰/۳۸	۰/۳۶	۰/۱۹
قابلیت هضم ماده‌آلی (درصد)		۴۴/۶۲	۴۴/۳۸	۴۳/۸۲	۴۴/۶۳	۰/۸۲۳	۰/۸۹	۰/۸۹	۰/۵۴
انرژی قابل‌متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)		۵/۲۹	۵/۲۵	۵/۱۶	۵/۳۱	۰/۱۴۵	۰/۸۹	۰/۹۷	۰/۵۴
اسیدهای چرب زنجیرکوتاه (میلی‌مول در لیتر)		۰/۵۸	۰/۵۷	۰/۵۶	۰/۵۸	۰/۰۲۱	۰/۸۹	۰/۹۸	۰/۵۴

b: پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) ، c: نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر بر ساعت)

فراسنجه‌های تخمیر شکمبه

نتایج حاصل از تأثیر افزودن سطوح مختلف بیوچار محصول فرعی پسته به جیره آزمایشی بر مقدار pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی، تعداد پروتوزوآ و اسیدهای چرب فرار بعد از۲۴ ساعت انکوباسیون در جدول ۳ نشان داده شده است. افزودن سطوح مختلف بیوچارمحصول فرعی پسته به جیره آزمایشی تأثیری بر جمعیت پروتوزوآ، غلظت اسیدهای چرب فرار (استیک، پروپیونیک، بوتیریک و ایزوبوتیریک) و نسبت استات به پروپیونات نداشت. در حالی‌که pH نسبت به تیمار شاهد افزایش (P<۰/۰۱) یافت. بررسی روند تغییرات نیز نشان داد که با افزایش سطح بیوچار در جیره‌های آزمایشی pH به‌صورت خطی افزایش (P<۰/۰۱)، و غلظت نیتروژن آمونیاکی (P<۰/۰۵) به‌صورت خطی کاهش یافت. از آن‌جا که میکروارگانیسم‌های شکمبه کربوهیدرات‌های غیرساختمانی جیره را به سرعت تخمیر می‌کنند و سبب افزایش یون هیدروژن و کاهش pH در محیط تخمیر می‌شوند. در این آزمایش افزایش pH محیط انکوباسیون می‌تواند مربوط به بالا بودن ظرفیت تبادل کاتیون بیوچار باشد، به‌طوری که گروه‌های عاملی با بار منفی سطح بیوچار نقش بازهای لوئیس را در جذب کاتیون‌ها ایفا می‌کنند و از این طریق با جذب سریع یون‌های هیدروژن از محیط تخمیر، سبب افزایش pH محیط شده‌اند (Cheng و همکاران، ۲۰۰۸). مطابق با نتایج این تحقیق مطالعات Feldmann (۱۹۹۲) نشان داده است افزودن ترکیبات کربنی به محیط کشت آزمایشگاهی، سبب افزایش pH محیط انکوباسیون شد.

افزودن سطوح ۱ و ۱/۵ درصد بیوچار محصول فرعی پسته به جیره‌های آزمایشی سبب کاهش (P<۰/۰۵) غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید. این نتایج با یافته‌های تحقیقات انجام‌شده بر روی دام زنده متفاوت است. در یک تحقیق افزودن ۰/۶ درصد بیوچار سبوس برنج به جیره گاوهای نر زبو سبب افزایش غلظت نیتروژن

آمونیاکی شکمبه گردید (Leng و همکاران، ۲۰۱۲b)، همچنین با افزودن ۰/۳ درصد ترکیبات کربنی فعال‌شده به جیره بزها افزایش آمونیاک شکمبه گزارش شد (Garillo و همکاران، ۱۹۹۴). در مقابل افزودن بیوچار سبوس برنج (۱ درصد ماده خشک جیره) به جیره بزها اثری بر غلظت آمونیاک شکمبه نداشت (Silivong و Preston، ۲۰۱۵). در تأیید نتایج این تحقیق، با افزودن بیوچارهای حاصل از کاه میسکانتوس، کاه کلزا، سبوس برنج، تکه‌های چوب سفت و کاه گندم تولیدشده در دو درجه حرارت ۵۵۰ و ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد به محیط کشت، غلظت آمونیاک کاهش یافت به‌طوری که بیشترین کاهش مربوط به بیوچارهای تولیدشده در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد بود، و به بالاتر بودن ظرفیت تبادل کاتیون در بیوچارهای تولیدشده در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد نسبت داده شد (افزایش دمای پیرولیزیس باعث کاهش ظرفیت تبادل کاتیون می‌شود) که جذب بیشتر آمونیاک را در پی دارد (Cabeza و همکاران، ۲۰۱۸). در تحقیقات دیگر نیز کاهش نیتروژن آمونیاکی محیط‌های هضم بی‌هوازی با افزودن بیوچار به جذب بالای آمونیاک در سطح بیوچار نسبت داده شده است (Malinskaa و همکاران، ۲۰۱۴). غلظت آمونیاک در شرایط آزمایشگاهی برآیند تجزیهٔ پروتئین و مصرف آمونیاک توسط باکتری‌ها به‌خصوص باکتری‌های تجزیه کننده سلولز است (Nolan و Dobos، ۲۰۰۵). از این‌رو با توجه به اینکه با افزودن ترکیبات کربنی به‌محیط هضم بی‌هوازی، فعالیت و رشد میکروب‌های تجزیه کننده سلولز به‌واسطه مطلوب‌شدن جایگاه سکونت میکروبی و افزایش pH محیط شکمبه بهبود می‌یابد (Kumar و همکاران، ۱۹۸۷) در این مطالعه کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزودن بیوچار به جیره‌های آزمایشی، احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت و جمعیت باکتری‌های مصرف‌کننده آن است.

افزودن سطوح مختلف بیوچار به جیره ها تأثیری بر مقدار اسیدهای چرب فرار تولید شده نداشت. در توافق با نتایج این تحقیق با افزودن بیوچارهای چوب درخت بلوط، چوب درخت لاله زینتی و چوب کاج سفید (۸۱ گرم در کیلوگرم ماده خشک) به جیره پایه (علوفه گراس اُرچارد) تغییری در تولید اسیدهای چرب فرار به روش برون‌تنی مشاهده نشد (McFarlane و همکاران، ۲۰۱۷). در مقابل با افزودن بیوچار حاصل از علوفه ذرت و چوب صنوبر به علوفه ری‌گراس خشک و سیلوشده مقدار اسیدهای چرب فرار در شرایط آزمایشگاهی افزایش یافت (Pereira و همکاران، ۲۰۱۴). این تفاوت در تولید اسیدهای چرب فرار می‌تواند مربوط به مقدار و نوع بیوچار استفاده‌شده و همچنین درجه حرارت مورد استفاده برای تولید بیوچار باشد (McFarlane و همکاران، ۲۰۱۷).

تولید متان

نتایج مربوط به‌تأثیر افزودن سطوح مختلف بیوچار محصول فرعی پسته به جیره‌های آزمایشی بر تولید متان در جدول ۳ نشان داده شده است. مهمترین اثر سودمند بیوچار را به کاهش انتشار متان در شکمبه مربوط دانسته‌اند (Leng و همکاران، ۲۰۱۳). در آزمایش حاضر نیز با افزایش سطح بیوچار محصول فرعی پسته در جیره‌ها تولید متان به صورت خطی ($P<0/01$) کاهش یافت.

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 سطوح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد از بیوچارهای پوست گردو و بستر مرغ تولید گاز متان را در شرایط آزمایشگاهی کاهش داد (میرحیدری و همکاران، ۱۳۹۶). همچنین افزودن ۰/۶ درصد از بیوچار سبوس برنج به جیره گاوهای زبو تولید متان را ۲۲ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش داد و این اثر بیوچار به‌خاصیت جذبی آن نسبت داده شده است (Leng و همکاران، ۲۰۱۲b). مطالعات نشان داده است که استقرار میکروبی در سطح بیوچار ارتباط نزدیک‌تر جمعیت‌های مختلف میکروبی را باعث می‌شود، به‌طوری که متان تولید شده توسط متانوژن‌ها، به فاصله کمی توسط متانوتروف‌ها برداشت می‌شود و از این طریق انتشار متان کاهش می‌یابد (Kajikawa و همکاران، ۲۰۰۳؛ Knittel و Boetius، ۲۰۰۹). از آن‌جا که وجود یون هیدروژن برای تولید متان توسط متانوژن‌ها لازم است گروه‌های عامل با بار منفی در سطح بیوچار با جذب

هیدروژن (Cheng و همکاران، ۲۰۰۸)، ماده اصلی لازم برای تولید متان را از محیط خارج می‌کنند و از این طریق نیز بر کاهش تولید متان اثر دارند. علاوه بر این ساختار خاص فیزیکوشیمیایی بیوچار در افزایش فعالیت متانوژن‌های ساکن در سطح آن در جهت اکسیداسیون بخشی از متان (۰/۲ تا ۰/۵ درصد) از طریق واکنش برگشتی مؤثر است به‌طوری که در این واکنش سولفات به‌عنوان گیرنده نهایی الکترون[3] عمل می‌کند (Kajikawa و همکاران،۲۰۰۳).

جدول۳- اثر سطوح مختلف بیوچار محصول فرعی پسته در جیره‌های آزمایشی بر pH، نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)، تعداد پروتوزوآ، غلظت اسیدهای چرب فرار و متان

فراسنجه‌ها	شاهد	بیوچار محصول فرعی پسته			SEM	P-value		
		۰/۵	۱/۰	۱/۵		تیمار	خطی	درجه دو
pH	۶/۲۷^{b}	۶/۵۹^{a}	۶/۵۳^{a}	۶/۴۲^{a}	۰/۰۲۶	<۰/۰۱	<۰/۰۱	۰/۰۶
نیتروژن آمونیاکی	۱۵/۶۷^{a}	۱۴/۰۹^{ab}	۱۳/۵۲^{b}	۱۳/۴۹^{b}	۰/۵۳۶	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۱۷
پروتوزوآ Log_{10}(cfu/ml)	۴/۰۵	۴/۷۵	۴/۱۶	۴/۸۶	۰/۶۴۲	۰/۷۵	۰/۵۵	۰/۹۹
کل اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول بر لیتر)	۴۹/۰۰	۵۶/۵۰	۴۹/۰۰	۵۲/۰۰	۲/۳۰۴	۰/۲۱	۰/۸۹	۰/۳۸
استیک (میلی‌مول بر لیتر)	۲۰/۰۰	۲۱/۰۰	۲۲/۸۷	۲۶/۰۰	۳/۴۳۷	۰/۶۵	۰/۲۶	۰/۷۷
پروپیونیک (میلی‌مول بر لیتر)	۱۴/۵۰	۱۴/۰۰	۱۳/۵۰	۱۲/۰۰	۰/۷۹۰	۰/۲۷	۰/۰۸	۰/۵۶
بوتیریک (میلی‌مول بر لیتر)	۱۰/۵۰	۱۰/۵۰	۱۱/۵۰	۱۲/۰۱	۰/۴۹۶	۰/۲۱	۰/۰۶	۰/۶۳
استیک/پروپیونیک (میلی‌مول بر لیتر)	۱/۳۹	۱/۸۵	۱/۵۶	۱/۹۱	۰/۲۴۵	۰/۴۸	۰/۳۱	۰/۸۴
متان (میلی‌لیتر/ گرم ماده خشک نمونه)	۱۵/۰۳^{a}	۱۱/۰۶^{ab}	۸/۲۶^{b}	۷/۲۱^{b}	۱/۲۱۹	<۰/۰۱	<۰/۰۱	۰/۲۷
متان (درصد)	۵۷/۰۸^{a}	۴۲/۰۶^{ab}	۳۲/۳۶^{b}	۲۷/۱۵^{b}	۳/۹۹۵	<۰/۰۱	<۰/۰۱	۰/۲۵

میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دارمی‌باشند (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن بیوچار محصول فرعی پسته به جیره‌های پایه در شرایط آزمایشگاهی انتشار متان و تولید آمونیاک را کاهش داد. بنابراین استفاده از سطوح ۱ و ۱/۵ درصد بیوچار محصول فرعی پسته در جیره ممکن است سبب بهبود شرایط تخمیر در شکمبه شوند.

پاورقی‌ها

1- Biochar
2- Syntrophism
3- $CH_4 + SO_4^{2-} \longrightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O$

منابع

میرحیدری، ا.، تربتی‌نژاد، ن.، حسنی، س و شاکری، پ. (۱۳۹۷). تاثیر سطوح مختلف بیوچار حاصل از پوست گردو و بسترمرغ بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه و تولید متان به‌روش برون تنی. نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. شماره ۱۱۷، صفحات. ۱۶۲-۱۵۱.

Ahmad, M., Rajapaksha, A.U., Lim, J.E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., et al. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. *Journal of Chemosphere*. 99: 19-33.

Bopp, C., Christl, I., Schulin, R. and Evangelou, M.W.H. (2016). Biochar as possible long-term soil amendment for phytostabilisation of TCE-contaminated soils. *Journal of Environmental Science and Pollution Research*. 23: 17449-17458.

Broderick, G.A. and Kang, J.H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*. 63: 64-75.

Cabeza, I., Waterhouse, T., Sohi, S. and Rooke, J.A. (2018). Effect of biochar produced from different biomass sources and at different process temperatures on methane production and ammonia concentrations *in vitro*. *Journal of Animal Feed Science and Technology*. 237: 1-7.

Cheng, C.H., Lehmann, J. and Engelhard, M.H. (2008). Natural oxidation of black carbon in soils: Changes in molecular form and surface charge along a climosequence. *Journal of Geochimica et Cosmochimica Acta*. 72: 1598-1610.

Chu, G.M., Jung, C.K., Kim, H.Y., Ha, J.H., Kim, J.H., Jung, M.S., et al. (2013). Effects of bamboo charcoal and bamboo vinegar as antibiotic alternative on growth performance, immune responses and fecal microflora population in fattening pigs. *Journal of Animl Science*. 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. *Journal of Advanced Research*.8: 297-307.

Dehority, B.A. (1984). Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 48: 182-185.

Demeyer, D., DeMeulemeester, M., DeGraeve, K. and Gupta, B.W. (1988). Effect of fungal treatment on nutritive value of straw. *Journal of the Faculty of Medicine*. 53: 1811-1819.

Fedorak, P.M. and Hurdy, D.E. (1983). A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Journal of Environmental Technology*. 4:425-432.

Feldmann, M. (1992). Auswirkungen von Aktivkohle auf Fermentationvorgänge im Pansensaft des Rindes (*in vitro*), Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover.

France, J. and Siddons, R.C. (1993). Volatile fatty acid production. P: 157, In: Forbes, J.M., J. France (eds). Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. CAB International, Cambridge, UK

Garillo, E.P., Pradhan, R. and Tobioka, H. (1994). Effects of activated charcoal on ruminal characteristics and blood profiles in mature goats. *Journal of Animal Science*. 35:85-89.

Gerlach, A. and Schmidt, H.P. (2012). The use of biochar in cattle farming. *Journal of Biochar*. 281-285.

Getachew, G., Makkar, H.P.S. and Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science*. 139: 341-352.

Hansen, H.H., Storm, I.M.L.D. and Sell, A.M. (2013). Effect of biochar on *in vitro* rumen methane production. *Journal of Animal Science.* 62: 305-309.

Johnson, K.A. and Johnson, D.E. (1995). Methane emission from cattle. *Journal of Animal Science*. 73: 2483-2492.

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. *Journal of Applied Microbiology*. 36: 354-357.

Knittel, K. and Boetius, A. (2009). Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *Journal of Annual Review Microbiology*. 63: 311-344.

Kumar, S., Jain, M.C. and Chhonkar, P.K. (1987). A note on stimulation of biogas production from cattle dung by addition of charcoal. *Journal of Biological Wastes*. 20: 209-215.

Lehmann, J. (2007). Bio-energy in the black. *Journal of Frontiers in Ecology and the Environment*. 5: 381-387.

Lehmann, J., Rilling, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C. and Crowley, D. (2011). Biochar effects on soil biota–Areview. *Journal of Soil Biology and Biochemistry*. 43: 1812-1836.

Leng, R.A. (2014). Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Journal of Animal Production Science*. 54: 519-543.

Leng, R.A., Inthapanya, S. and Preston, T.R. (2012a). Biochar lowers net methane production from rumen fluid *in vitro*. *Journal of Livestock Research for Rural Development*. 24: 1-6.

Leng, R.A. Preston, T.R. and Inthapanya, S. (2012b). Biochar reduces enteric methane and improves growth and feed conversion in local "Yellow" cattle fed cassava root chips and fresh cassava foliage. *Journal of Livestock Research for Rural Development*. 24: 199-211.

Leng, R.A., Preston, T.R. and Inthapanya, S. (2012c). Methane production is reduced in an *in vitro* incubation when the rumen fluid is taken from cattle that previously received biochar in their diet. *Journal of Livestock Research for Rural Development*. . 24: 24-30.

Leng, R.A., Inthapanya, S. and Preston, T.R. (2013). All biochars are not equal in lowering methane production in *in vitro* rumen incubations. *Journal of Livestock Research for Rural Development*. 25: 100-106.

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. *Journal of Water Research*. 68: 710-718.

Mali´nskaa, K., ´Swiatek, M.Z. and Dach, J. (2014). Effects of biochar amendment on ammonia emission duringcomposting of sewage sludge. *Journal of Ecological Engineering*. 71: 474-478.

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. *Journal of Agriculture Science*. 8: 316-325.

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. *Journal of Animal Research and Development*. 28: 7-55.

Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C. and Newbold, C.J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Journal of Animal Consortium*. 4: 1024-1036.

Nolan, J.V. and Dobos, R.C. (2005). Nitrogen transactions in ruminants. P: 177-206, In: Dijkstra, J., J.M. Forbes and J. France (eds). Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. CABI Publishing, Walingford, UK.

NRC. (2007). Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. National Academy Press. PP: 384.

Odesola, I.F. and Owoseni, T.A. (2010). Development of local technology for a small-scale biochar production processes from agricultural wastes. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*. 1: 205-208.

Ørskov, E.R. (1982). Protein Nutrition in Ruminants. Academic Press, London and NewYork. PP: 125.

Ørskov, E.R. and McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agriculture Science*. 92: 499-503.

Patra, A.K. and Saxena, J. (2009). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Journal of Microbiology*. 96: 363-375.

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. *Journal of Animal Feed Science Technology*. 196: 220-231.

Prasai, T.P., Walsh, K.B., Bhattarai, S.P., Midmore, D.J., Van, T.T.H., Moore, R.J., et al. (2016). Biochar, bentonite and zeolite supplemented feeding of layer chickens alters intestinal microbiota and reduces campylobacter. *Journal of PLoS One.* 11: 1-13.

Samonin, V.V. and Elikova, E.E. (2004). A study of the adsorption of bacterial cells on porous materials. *Journal of Microbiology*. 73: 696-701.

SAS. (2003). SAS User's Guide Statistics. Version 9.1 Edition. SAS Inst., Cary, NC.

Seredych, M. and Bandosz, T.J. (2007). Mechanism of ammonia retention on graphite oxides: role of surface chemistry and structure. *Journal of Physical Chemistry*. 111: 15596-15604.

Shakeri, P., Durmic, Z., Vadhanabhuti, J. and Vercoe, P.E. (2017). Products derived from olive leaves and fruits can alter *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 97: 1367-1372.

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. *Journal of Livestock Research for Rural Development*. 27: 1-9.

Steiner, S., Das, K.C., Melear, N. and Lakly, D. (2010). Reducing nitrogen lossduring poultry litter composting using biochar. *Journal of Environmental Quality*. 39: 1236-1242.

Tabaru, H., Kadota, E., Yamada, H., Sasaki, N. and Takeuchi, A. (1988). Determination of volatile fatty acids and lactic acid in bovine plasma and ruminal fluid by high performance liquid chromatography. *Journal of Veterinary Science*. 50: 1124-1126.

Tamminga, S. (1992). Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *Journal of Dairy Science*. 75: 345-357.

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. *Journal of Animal feed Science and Technology*. 130: 242-256.