نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۳، تابستان ۱۳۹۸
ص‌ص: ۱۶۷~۱۸۲

بررسی آزمایشگاهی اثرات وابسته به دوز آنتی بیوتیک سالینومایسین بر تخمیر شکمبه و برخی از جمعیتهای میکروبی شکمبه با استفاده از روش Real-time PCR

- **نسیبه نویدی مقدم**
دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
- **مصطفی ملکی**(نویسنده مسئول)
استادیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
- **اصغر میرزائی اصل**
دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

تاریخ دریافت : مرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۸۱۸۷۶۸۲
Email: mmalecky@basu.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.122848.1744

چکیده

تحقیق حاضر به‌منظور بررسی آزمایشگاهی اثرات آنتی‌بیوتیک سالینومایسین در دوزهای مختلف (صفر، ۲، ٤، ۸ و ١٦ میلی‌گرم بر لیتر) بر کینتیک تولید گاز، برخی شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه و در دوزهای صفر، ٤ و ١٦ میلی‌گرم بر لیتر بر برخی جمعیت‌های میکروبی شکمبه با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. برای این منظور از سه رأس گوسفند نر فیستولادار جهت تهیه مایع شکمبه برای انکوباسیونهای ١٤٤ ساعته در مرحله اول و انکوباسیونهای ٢٤ ساعته در مرحله دوم آزمایش استفاده شد. نتایج نشان داد که با افزایش دوز سالینومایسین گاز تولیدی در تمامی ساعات و حداکثر گاز تولیدی (A) بصورت خطی و درجه دو افزایش یافت. با این حال، نرخ تولید گاز (μ) تحت تأثیر قرار نگرفت. همچنین میزان گاز تولیدی بعد از ٢٤ ساعت (GP_{24})، میزان هضم آزمایشگاهی ماده خشک (IVTDMD) و ماده آلی (IVTOMD) و غلظت کل اسیدهای چرب فرار (TVFA) بموازات افزایش دوز سالینومایسین بطور خطی و درجه دو افزایش یافتند، اما فاکتور تفکیک (PF) کاهش یافت و توده میکروبی (MB) و غلظت آمونیاک تحت تأثیر سالینومایسین قرار نگرفتند. در بین میکروارگانیسم‌های شکمبه، جمعیت نسبی پروتوزوآها و *فیبروباکترسوکسینوژنز*[1] در بالاترین دوز سالینومایسین کاهش یافت و جمعیت قارچها، متانوژنها و باکتری *کلستریدیوم آمینوفیلوم*[1] تحت تأثیر سالینومایسین قرار نگرفت. این نتایج نشان داد که سالینومایسین اثرات مثبتی بر شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه‌ای دارد که با توجه به یافته های نوین مبنی بر اثرات آن در پیشگیری از انواع سرطان در انسان می‌تواند در تغذیه دام به‌عنوان افزودنی استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: یونوفر، سالینومایسین، تخمیر شکمبه، میکروبهای شکمبه، Real-time PCR

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 123 pp: 167-182

The effect of *Prosopis farcta* on the performance, some blood parameters, immune and antioxidant system of broiler chickens under heat stress conditions.

By: Nasibeh Navidi Moghadam[1], Mostafa Malecky[2,*] and Asghar Mirzaei Asl [3]
[1] M.Sc. Graduated of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University
[2] Assistant Professor at Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University
[3] Assistant Professor at Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University

Received: August 2018 **Accepted: September 2018**

The present study was conducted to assess the effects of salinomycin antibiotic at different doses (0, 2, 4, 8 and 16 mg/L) on gas production kinetics, some rumen digestion and fermentation indices, and at the doses of 0, 4 and 16 mg/L on some rumen microbial populations using Real-time PCR method. For this purpose, three ruminally fistulated male rams were used to collect the rumen fluid for incubations of 144 h in the first and incubations of 24 h in the second phase of the experiment. Results indicated that the gas produced at all the measured times and the asymptotic gas production (A) increased linearly and quadratically with increasing doses of salinomycin. However, the gas production rate (μ) was not affected by the treatment. The gas produced after 24 h of incubation (GP_{24}), *in vitro* true dry matter degradability (IVTDMD), *in vitro* true organic matter degradability (IVTOMD) and total volatile fatty acid (TVFA) concentration increased in a linear and quadratic manner, but partitioning factor (PF) decreased and microbial biomass (MB) and ammonia concentration were not affected by salinomycin. Among the rumen microorganisms, the relative population of protozoa and *Fibrobacter succinogens* decreased at the highest dose of salinomycin and those of fungi, methanogens and *Clostridium aminophilum* remained unaffected by salinomycin. These results revealed that salinomycin has a positive impact on rumen digestion and fermentation indices, which regarding recent findings on its effects in preventing different kinds of human cancer, it can be used as feed additive in animal nutrition.

Key words: Ionophore, salinomycin, rumen fermentation, rumen microbes, Real-time PCR.

مقدمه

امروزه نقش محوری نشخوارکنندگان در تأمین بخش عمده ای از منابع پروتئینی مورد مصرف جوامع انسانی بر کسی پوشیده نیست. با اینحال، راندمان استفاده از مواد مغذی خوراکها در نشخوارکنندگان به دلیل هدر رفت بخشی از آنها در شکمبه بطور نسبی پایین است، بطوریکه بخش قابل توجهی از انرژی (تا ۱۲ درصد) و نیتروژن (تا ۵۰ درصد) جیره می تواند به ترتیب بصورت گاز متان و آمونیاک هدر رود (Callaway و همکاران، ۲۰۰۳). یکی از راهکارهای ارائه شده توسط متخصصین تغذیه دام، استفاده از افزودنیهای خوراک برای اصلاح تخمیر شکمبه بوده که در این میان، استفاده از آنتی بیوتیکها در طی دهه های اخیر اثرات مثبت زیادی بر راندمان تولید در صنعت دام داشته است. در واقع اولین گزارش از اثرات محرک رشد و تولید آنتی بیوتیکها به اوایل دهه پنجاه میلادی بر می‌گردد (Page، ۲۰۰۶). بهبود عملکرد دامها توسط آنتی بیوتیک‌ها بواسطه اثرات متعدد آنها بر عملکرد دستگاه هضمی همچون افزایش تولید ویتامینها (Groschke وEvans، ۱۹۵۰)، کاهش جمعیت باکتریهای مضر در دستگاه گوارش (Dibner وRichards، ۲۰۰۵)، کاهش فعالیت اوره‌آزی در روده (Visek، ۱۹۷۰)، بهبود عملکرد هضم و جذب مواد مغذی در روده (Yen و همکاران، ۱۹۸۷)، کاهش تجزیه نمکهای صفراوی، افزایش فعالیت آنزیمی روده (Foster، ۱۹۷۲) و

کاهش تحریک سیستم ایمنی (Roura و همکاران، ۱۹۹۲) بوده است. در نشخوارکنندگان، عمده اثرات مثبت آنتی بیوتیک‌ها بواسطه تغییر جمعیت میکروبی شکمبه و متعاقب آن تغییر الگوی تخمیر در جهت کاهش تولید متان (Johnson وJohnson، ۱۹۹۵)، افزایش تولید پروپیونات (Richardson و همکاران، ۱۹۷۶؛ Russell وStrobel، ۱۹۸۹) و همچنین کاهش تجزیه پروتئین خوراک و تولید آمونیاک بوده است (Russell وStrobel، ۱۹۸۹). در اواخر دهه ۹۰ میلادی بواسطه افزایش نگرانی ناشی از یافته‌های جدید مبنی بر افزایش مقاومت میکروبی نسبت به آنتی بیوتک‌ها به دلیل باقی ماندن و تجمع آنها در فرآورده‌های دامی، استفاده از تعداد زیادی از آنتی بیوتیک‌ها در تغذیه دام در اروپا ممنوع گردید (Corpet، ۲۰۰۰). با این‌حال، استفاده از گروهی از آنتی بیوتیکها تحت عنوان یونوفرها همچنان بعنوان افزودنی در تغذیه دامها تا سالها ادامه یافت و امروزه هم در بسیاری از کشورها استفاده می شود که علت آن مبتنی بر شواهدی حاکی از عدم ایجاد مقاومت میکروبی توسط یونوفرها بدلیل ساختار پیچیده آنها است (Callaway و همکاران، ۲۰۰۳).

یونوفرها گروهی از آنتی بیوتیکها با ویژگی چربی دوستی بالا هستند که اثرات آنتی میکروبی‌شان ناشی از اثرات آنها بر تغییر گرادیان غلظتی کاتیونها در دو طرف غشاء سلولی در میکروبها می باشد(Ovchinnikov، ۱۹۷۹). اثرات مثبت یونوفرها در اصلاح تخمیر شکمبه مشتمل بر تغییر الگوی تخمیر شکمبه به سمت کاهش تولید متان و افزایش تولید پروپیونات (Chalupa، ۱۹۷۷؛ Rogers وDavis، ۱۹۸۲)، کاهش تولید آمونیاک (Chen وRussell، ۱۹۹۱) و افزایش ابقاءنیتروژن (Muntifering و همکاران، ۱۹۸۱)، کاهش نفخ (Usagawa، ۱۹۹۲)، کاهش اسیدوز شکمبه ای و افزایش هضم فیبر بواسطه کاهش نرخ عبور بوده است (Cooper و همکاران، ۱۹۹۹). با وجود اثرات مثبت بسیاری از یونوفرها بر عملکرد دامها، عمده تحقیقات انجام شده روی یونوفرها بعنوان افزودنی محرک رشد در تغذیه دامها معطوف به دو یونوفر رایج مونسین و لاسالوسید بوده است (Callaway و همکاران، ۲۰۰۳؛ Azzaz و همکاران، ۲۰۱۲).

در این میان، سالینومایسین یک یونوفر پلی اتر می‌باشد که بیشتر بعنوان یک کوکسیدیواستات شناخته شده و در طیور و گوساله استفاده می‌شود. با این وجود، تحقیقات محدودی نیز حاکی از اثرات مثبت آن بر تخمیر شکمبه همچون کاهش تولید متان، بهبود هضم شکمبه‌ای، کاهش نرخ اسیدوز، کاهش تولید آمونیاک و بهبود الگوی تخمیر می باشد (Febel و همکاران، ۲۰۰۱؛ Bharath Kumar و همکاران، ۲۰۱۰؛ Sirohi وGoel، ۲۰۱۲). از طرف دیگر، تحقیقات انجام گرفته در سالهای اخیر حکایت از پتانسیل ویژه سالینومایسین در نابودی سلولهای اولیه سرطانی در انسان و موش دارد (Naujokat و همکاران، ۲۰۱۰) که اهمیت آن را در تغذیه دام و بطور غیر مستقیم در انسان را بیشتر می کند. با توجه به اثرات وابسته به دوز اغلب آنتی بیوتیک‌ها بر تخمیر شکمبه، اطلاعات بسیار کمی در این رابطه در مورد سالینومایسین و به خصوص اثرات آن در دوزهای مختلف بر جمعیت‌های میکروبی شکمبه بصورت مخلوط وجود دارد.

لذا هدف از تحقیق اخیر بررسی اثرات سالینومایسین در دوزهای مختلف بر شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه و مطالعه اثرات آن روی برخی از جمعیتهای میکروبی شکمبه با استفاده از روش Real-time PCR بود.

مواد و روشها

مراحل آزمایش و تیمارهای آزمایشی

تحقیق حاضر در قالب یک آزمایش دو مرحله‌ای انجام شد، بدین شکل که اثرات سالینومایسین در دوزهای مختلف بر کینتیک تولید گاز شکمبه ای در مرحله اول با استفاده از انکوباسیونهای ۱۴۴ ساعته، و اثر آن بر برخی شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه، تولید پروتئین میکروبی و همچنین بر برخی جمعیت‌های میکروبی شکمبه در مرحله دوم آزمایش با استفاده از دو سری انکوباسیونهای ۲۴ ساعته مورد بررسی قرار گرفت. سطوح مختلف سالینومایسین شامل صفر میلی گرم بر لیتر (به‌عنوان شاهد) و ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی گرم بر لیتر بعنوان سطوح تیماری در نظرگرفته شد. سوبسترای تخمیر مورد استفاده در تمامی آزمایش‌ها یک جیره

برای بره های پرورای متشکل از(بر اساس مادهٔ خشک) ۵۲ درصد یونجهٔ خشک، ۷ درصد کاه گندم، ۴۰ درصد جو، ۰/۵ درصد نمک و ۰/۵ درصد پرمیکس معدنی-ویتامینی بود. ترکیب شیمیایی جیره آزمایشی نیز (درصد از مادهٔ خشک) شامل ۹۲ درصد مادهٔ آلی، ۱۲/۸ درصد پروتئین خام، ۴۱ درصد فیبر نامحلول در شویندهٔ خنثی و ۲/۴ مگاکالری بر کیلو گرم انرژی قابل متابولیسم بود.

دام‌ها و مایع شکمبه

آزمایش حاضر در سال ۹۶ و در آزمایشگاه تغذیه دام دانشگاه بوعلی سینا انجام شد. مایع شکمبه از سه رأس گوسفند نر نژاد مهربان (۴ ±۵۰ کیلوگرم وزن بدن) مجهز به فیستولای شکمبه‌ای در ایستگاه دامپروری دانشگاه بوعلی سینا، قبل از خوراک‌دهی نوبت صبح تهیه گردید. دامها یک جیره نگهداری شامل ۶۰ درصد یونجه، ۹ درصد کاه، ۳۰ درصد جو، ۰/۵ درصد نمک و ۰/۵ درصد مکمل معدنی و ویتامینی حاوی ۱۲/۵ درصد پروتئین خام و ۲/۳ مگاکالری انرژی قابل متابولیسم بر کیلوگرم دریافت نمودند. نمونه‌های مایع شکمبه گرفته شده بعد از مخلوط شدن با استفاده از پارچه متقال چهار لایه صاف شد و با استفاده از یک فلاسک عایق حرارتی از قبل گرم شده به آزمایشگاه منتقل گردید و تحت جریان گاز دی اکسیدکربن در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد تا شروع آزمایش نگهداری شد.

آزمون تولید گاز

آزمون تولید گاز مطابق با روش Menke و Steingass (۱۹۸۸) انجام گرفت. بطور خلاصه یک نمونه معرف از سوبسترای تخمیر با الک ۱ میلی متری آسیاب شد. در مرحله اول آزمایش، مقدار ۲۰۰ میلی گرم (بر حسب ماده خشک) از جیره آزمایشی در سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی لیتری (هابرله فورتون، آلمان) ریخته شده و مقدار ۳۰ میلی لیتر مایع شکمبه بافری شده (به نسبت ۲ به ۱ بافر: مایع شکمبه) و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی سالینومایسین بطوری‌که تأمین کنندهٔ دوزهای تعیین شده در محیط کشت باشد، به آن اضافه شد (سه تکرار برای هر تیمار). برای تهیه محلول سالینومایسین، پودر سالینومایسین (Vetacox 120, Huvepharma, Bulgaria) در ابتدا در متانول خالص حل شده و با آب دیونیزه برای تهیه غلظتهای مورد نظر برای استفاده در محیط کشت رقیق گردید. همچنین سه سرنگ شیشه ای حاوی مایع شکمبه بافری شده و بدون سوبسترا و سالینومایسین، بعنوان بلانک در نظر گرفته شد. انکوباسیون سرنگ‌های شیشه‌ای در یک حمام آبی با دمای ۳۹ درجه سانتیگراد به مدت ۱۴۴ ساعت انجام گرفت و گاز تولیدی در زمانهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت اندازه‌گیری شد. در مرحله دوم آزمایش و در سری اول انکوباسیون‌های ۲۴ ساعته، مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از سوبسترای تخمیر با ۴۰ میلی لیتر از مایع شکمبه بافری شده و دوزهای صفر، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی گرم بر لیتر سالینومایسین در سه تکرار و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد (Makkar و همکاران، ۱۹۹۵). در پایان انکوباسیون، تمامی محتویات سرنگها به لوله های فالکون منتقل شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت g ×۵۰۰۰ سانتریفیوژ شده و مایع رویی پس از فیلتراسیون با کاغذ صافی واتمن ۴، نمونه های ۴ میلی‌لیتری از آن با ۱ میلی لیتر اسید ارتوفسفریک ۲۵ درصد مخلوط شده و جهت تعیین محتوی آمونیاک و اسیدهای چرب فرار در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. باقیمانده هضم نشده سوبسترا در لوله ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجهٔ سانتیگراد خشک شده و وزن آنها تعیین گردید. بقایای خشک شده به مدت ۱ ساعت در محلول شویندهٔ خنثی جوشانده شده و با استفاده از پارچه پلی استر (با قطر منافذ ۴۰ میکرومتر) صاف و دوباره به

مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجهٔ سانتیگراد خشک شده و میزان هضم حقیقی ماده خشک سوبسترا (IVTDMD) تعیین گردید. میزان هضم حقیقی مادهٔ آلی (IVTOMD) بعد از تعیین محتوی خاکستر بقایای خشک حاصله از مرحلهٔ قبل برآورد گردید. در مرحله دوم نیز سه سرنگ شیشه‌ای حاوی مایع شکمبه و بدون سوبسترا و اسانس روغنی به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. همچنین، نسبت ماده آلی هضم شدهٔ حقیقی (میلی گرم) به حجم گاز تولیدی (میلی لیتر) بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون به عنوان فاکتور تفکیک (PF) (Blummel و همکاران، a۱۹۹۷) و اختلاف وزنی بین بقایای هضم نشده سوبسترا در انتهای انکوباسیون (بصورت ماده خشک) و مقدار باقیمانده بعد از شستشو در محلول شویندهٔ خنثی به عنوان تودهٔ میکروبی (MB) در نظر گرفته شد (Blummel و همکاران، b۱۹۹۷). سری دوم انکوباسیونهای ۲۴ ساعته برای استخراج DNA میکروبی انجام شد. برای این منظور با توجه به نتایج آزمایشات اولیه، سه دوز از سالینومایسین (صفر، ۴ و ۱۶ میلی گرم لیتر) استفاده شد و بقیه مراحل کار مشابه انکوباسیونهای سری اول بود. در نهایت بعد از اتمام انکوباسیون کلیه محتویات سرنگها در لوله های فالون ریخته شده و برای مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

استخراج DNA میکروبی و ارزیابی کمی و کیفی آن

برای استخراج DNA میکروبی، مقدار ۱/۵ میلی لیتر از نمونه های مایع شکمبه بعد از هموژنیزه شدن در تیوپهای دو میلی لیتری ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ xg سانتریفیوژ گردید و از پلاک میکروبی بدست آمده DNA استخراج گردید. برای این منظور، از دو روش استخراج استفاده شد و راندمان استحصال DNA با استفاده از اسپکروفوتومتر نانو دراپ مورد بررسی قرار گرفت. در روش اول از کیت استخراج DNA (Stool DNA Isolation mini kit, Favorgen, Taiwan) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و در روش دوم از پروتکل پیشنهادی Yu و Morrison (۲۰۰۴) استفاده گردید. در نهایت با توجه به راندمان بالاتر استخراج، روش دوم برای استخراج کلیه نمونه ها انتخاب شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و همچنین دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ بررسی گردید و غلظت DNA در همه نمونه ها همسان سازی شد.

آغازگرهای استفاده شده و بررسی اختصاصی بودن آنها با استفاده از PCR

آغازگرهای استفاده شده شامل آغازگرهای اختصاصی برای توتال باکتری (بعنوان ژن مرجع)، پروتوزوآها، قارچها، متانوژنها، فیبروباکترسوکسینوژنز بعنوان یکی از باکتریهای مهم هضم کننده فیبر و کلستریدیوم آمینوفیلوم بعنوان یکی از باکتریهای مهم تولید کننده آمونیاک (HAP[1]) بود که در جدول ۱ آورده شده‌اند. جهت بررسی اختصاصی بودن پرایمرها و تعیین شرایط بهینه تکثیر برای هر کدام از آنها، از کیت Super PCR Master Mix (Amliqon, Denmark) استفاده شد. واکنش PCR با برنامه دمایی و زمانی شامل واسرشته سازی اولیه در طی یک سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، تکثیر در طی ۴۰ سیکل با دمای واسرشته سازی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال متفاوت برای هر پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه و دمای توسعه ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، و توسعه نهایی در طی یک سیکل در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه بود. پس از تکثیر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و اختصاصی بودن باندهای تکثیر شده برای هر کدام از پرایمرها بررسی گردید.

[1] Hyper ammonia producer

جدول ۱- ویژگیهای آغازگرهای استفاده شده

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه	رفرنس
توتال باکتری	F: CGGCAACGAGCGCAACCC R: CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	۱۸ ۲۲	(Denman و McSweeney، ۲۰۰۶)
پروتوزوآها	F: GCTTTCGWTGGTAGTGTATT R: CTTGCCCTCYAATCGTWCT	۲۰ ۱۹	(Denman و همکاران، ۲۰۰۷)
قارچها	F: GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC R: CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	۲۸ ۲۵	(Denman و همکاران، ۲۰۰۷)
متانوژنها	F: TTCGGTGGATCDCARAGRGC R: GBARGTCGWAWCGTAGAATCC	۲۰ ۲۲	(Denman و همکاران، ۲۰۰۷)
فیبروباکتر سوکسینوژنز[1]	F: GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA R: CGCCTGCCCCTGAACTATC	۲۲ ۱۹	(Denman و McSweeney، ۲۰۰۶)
کلستریدیوم آمینوفیلوم[2]	F: ACGGAAATACAGAAGGAAG R: GTTTCCAAAGCAATTCCAC	۲۰ ۱۹	(Patra و Yu، ۲۰۱۴)

[1] *Fibrobacter succinogenes*
[2] *Clostridium aminophilum*

تعیین کمیت نسبی ژنوم جمعیتهای میکروبی با استفاده از Real-time PCR

برای این منظور از دستگاه ترموسایکلر (Roche, Germany) و کیت SYBR-Green Master Mix (Ampliqon, Denmark) استفاده شد. برنامه تکثیر ژنوم میکروبی برای Real-time PCR همانند برنامه قبلی توضیح داده شده برای PCR بود. کمیت نسبی ژنوم هر کدام از جمعیتهای میکروبی شکمبه با استفاده از داده های مربوط به سیکل آستانه ای (Ct) حاصل از Real-time PCR برای هر جمعیت و با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به کمک نرم افزار اکسل (Excel, 2016) تعیین گردید (Livak و Schmittgen، ۲۰۰۱).

آنالیزهای شیمیایی

اندازه گیری ماده خشک، ماده آلی، محتوی پروتئین خام، خاکستر خام و عصاره اتری مطابق با روشهای AOAC (۲۰۰۰) انجام گرفت. محتوی فیبر نامحلول در شوینده خنثی مطابق با روش Van Soest و همکاران (۱۹۹۱) ، محتوی آمونیاک با استفاده از روش فنل-هیپوکلریت (Broderick و Kang، ۱۹۸۰) و محتوی کل اسیدهای چرب فرار (TVFA) با استفاده از دستگاه مارخام و مطابق با روش Barnett و Reid (۱۹۵۷) اندازه گیری گردید.

برآوردها و محاسبات آماری

داده های مربوط به گاز تولیدی در ساعات مختلف در مرحله اول آزمایش بر مدل پیشنهادی توسط France و همکاران (۱۹۹۳) در ذیل برازش شده و پارامترهای کینتیک تولید گاز برآورد گردید:

$$GP = A\left\{1 - e^{-[b(t-L)+c(\sqrt{t}-\sqrt{L})]}\right\}$$

در این مدل GP: گاز تولیدی تجمعی در زمان t (میلی لیتر)، A: حداکثر گاز تولیدی (میلی لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، c,b: ضرائب ثابت و L: زمان تاخیر (ساعت) می باشند. همچنین $T_{1/2}$ (زمانی که نصف حداکثر گاز تولیدی تولید شده) و μ (نرخ تولید گاز بر حسب درصد بر ساعت) با استفاده از

فرمولهای پیشنهادی توسط France و همکاران (۱۹۹۳) و به کمک نرم افزار مینی‌تب (Minitab, Ver. 16) محاسبه گردید. آزمایشات مراحل اول و دوم در دو روز متفاوت تکرار گردید و داده های مربوط به کینتیک تولید گاز و شاخصهای هضم و تخمیر در قالب یک طرح کاملا تصادفی و بصورت تجزیه مرکب به کمک رویه MIXED نرم افزار SAS و با استفاده از مدل زیر مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + e_{(j)k} + T_{ij}*D_j + E_{ijk}$$

که در آن

μ: میانگین، Ti : اثر تیمار iام، $e_{(i)k}$: اثر خطای اصلی ناشی از تکرارهای مرتب شده در روز، D_j : اثر روز، T_i*D_j: برهم‌کنش اثر تیمار در روز و e_{ijk}: خطای باقیمانده می باشند که در بین آنها اثر تیمار بعنوان اثر ثابت و بقیه متغیرها بعنوان عوامل تصادفی در نظر گرفته شد. همچنین روند پاسخ (خطی و درجه دو) به غلظت سالینومایسین با استفاده از آنالیز رگرسیون (رویه NLINE نرم افزار SAS) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در صورت معنی دار بودن اثر تیمارها، حداقل مربعات میانگینها با استفاده از آزمون توکی کرامر در سطح معنی داری ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. همانطور که قبلا اشاره شد، با توجه به نتایج مربوط به پارامترهای کینتیک تولید گاز و مؤلفه‌های هضم و تخمیر (در اغلب موارد اثرات افزاینده خطی مشاهده شد)، برای بررسی اثرات تیمارها بر جمعیتهای میکروبی، سه سطح تیماری شامل صفر، ۴ و ۱۶ میلی گرم بر لیتر سالینومایسین انتخاب گردید. داده های این آزمایشات با استفاده از یک طرح کاملا تصادفی و به کمک رویه GLM نرم افزار SAS (SAS، ۲۰۰۲) مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

اثرات آنتی بیوتیک سالینومایسین بر کینتیک تولید گاز

استفاده از سالینومایسین در محدوده غلظتی صفر تا ۱۶ میلی گرم بر لیتر موجب افزایش غیر خطی (خطی و درجه دو) در تمامی ساعات بعد از انکوباسیون و همچنین حداکثر گاز تولیدی گردید ($P < ۰/۰۵$)، در این میان، تفاوت بین تیمارها معنی دار بود (جدول ۲). استفاده از سالینومایسین همچنین موجب افزایش فاز تأخیر گردید و این افزایش بصورت خطی بود ($P < ۰/۰۵$). با این حال، زمانیکه نصف گاز حداکثری تولید می‌شود و همچنین نرخ تولید گاز تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفته و بموازات افزایش غظت سالینومایسین روند مشخصی در این شاخص‌ها مشاهده نگردید.

جدول۲- اثرات سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک سالینومایسین بر مؤلفه‌های کینتیک تولید گاز شکمبه‌ای

مؤلفه[1]	سالینومایسین (میلی گرم بر لیتر)					SEM	P-value		
	صفر	۲	۴	۸	۱۶		تیمار	خطی	درجه دو
GP_2	۱۸/۵^{c}	۲۰/۰^{abc}	۱۹/۷^{bc}	۲۳/۰^{ab}	۲۴/۰^{a}	۰/۶۷	۰/۰۱۵	<۰/۰۰۱	۰/۰۲۲
GP_8	۴۹/۲^{b}	۵۴/۷^{ab}	۵۷/۵^{ab}	۶۳/۷^{ab}	۶۹/۰^{a}	۲/۸۲	۰/۰۲۸	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۳
GP_{16}	۶۰/۵^{c}	۶۶/۲^{bc}	۶۹/۸^{abc}	۷۸/۵^{ab}	۸۴/۸^{a}	۲/۵۰	۰/۰۱۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۲۹
GP_{24}	۶۷/۵^{c}	۷۴/۵^{bc}	۷۸/۲^{bc}	۸۷/۷^{ab}	۹۵/۳^{a}	۲/۵۶	۰/۰۰۸	<۰/۰۰۱	۰/۰۲۶
GP_{48}	۷۶/۶^{c}	۸۴/۴^{bc}	۸۸/۹^{bc}	۹۸/۹^{ab}	۱۰۷/۶^{a}	۲/۴۹	۰/۰۰۵	<۰/۰۰۱	۰/۰۲۴
GP_{96}	۸۱/۴^{d}	۸۹/۹^{cd}	۹۶/۱^{bc}	۱۰۶/۳^{ab}	۱۱۶/۳^{a}	۲/۱۹	۰/۰۰۲	<۰/۰۰۱	۰/۰۱۰
GP_{144}	۸۲/۶^{d}	۹۲/۳^{cd}	۹۸/۶^{bc}	۱۰۸/۳^{ab}	۱۱۸/۹^{a}	۲/۰۶	۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۹
پارامتر[2]									
A	۸۱/۵^{e}	۹۰/۹^{d}	۹۶/۸^{c}	۱۰۶/۲^{b}	۱۱۶/۵^{a}	۰ /۷۲۲	۰/۰۰۱۴	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۸
L	۰/۰۰۴^{d}	۰/۰۰۶^{cd}	۰/۰۰۹^{a}	۰/۰۰۶^{bc}	۰/۰۰۸^{ab}	۰/۰۰۰۳	۰/۰۴۰	۰/۰۱۲	۰/۰۶۰
$T_{½}$	۶/۰۲	۶/۱۳	۶/۵۳	۶/۳۲	۶/۶۶	۰/۱۴۹	۰/۳۵۲	۰/۶۵۰	۰/۳۴۵
μ	۰/۰۷۸	۰/۰۷۵	۰/۰۷۲	۰/۰۷۷	۰/۰۷۵	۰/۰۰۲۷	۰/۸۸۵	۰/۶۲۵	۰/۶۸۰

[1] GP_2-GP_{144}: گاز تولیدی در ساعتهای مختلف بعد از انکوباسیون (میلی لیتر بر ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک).

[2] A: حداکثر گاز تولیدی (میلی‌لیتر بر ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، L: فاز تأخیر(ساعت)، $T_{½}$: زمانی که نصف حداکثر گاز تولیدی تولید شده (ساعت) μ: نرخ تولید گاز (بر ساعت).

SEM: خطای استاندارد بین میانگین‌ها.

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح خطای ۰/۰۵ است.

هرچند شاخص‌های کینتیک تولید گاز برای اول بار توسط Menke و Steingass (۱۹۷۹) برای تعیین ارزش غذایی علوفه ها استفاده شد، با این حال، با توجه به این حقیقت که اسیدهای چرب فرار و گاز تولید شده در نتیجه فعالیت میکروبهای شکمبه می باشند، لذا پارامترهای کینتیک تولید گاز می توانند شاخص خوبی از الگوی فعالیت آنها باشند. در آزمایش حاضر، افزایش حداکثر گاز تولیدی به موازات افزایش دوز سالینومایسین می تواند در نتیجه دو عامل مستقل باشد: با توجه به رابطه مستقیم بین میزان گاز تولیدی و میزان هضم شکمبه ای ماده آلی (Menke وSteingass، ۱۹۸۸)، این افزایش در حداکثر گاز تولیدی می تواند در مرحله اول در نتیجه بهبود هضم خوراک باشد. در این رابطه Sirohi و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که استفاده از سالینومایسین هم در جیره های پرکنسانتره و هم در جیره های پرعلوفه موجب افزایش هضم گردید. در تحقیق حاضر، در مرحله دوم آزمایش نیز مشاهده گردید که استفاده از سالینومایسین موجب افزایش هضم ماده خشک و آلی گردید که با این نتایج همخوانی دارد. عامل دوم افزایش حداکثر گاز تولیدی می تواند در نتیجه تغییر الگوی تخمیر به سمت مسیر تولید اسیدهای چرب فرار و گاز بیشتر نسبت به مسیر تولید توده میکروبی باشد(Blummel و همکاران، b۱۹۹۷). این فرضیه با تغییرات فاکتور تفکیک بهنگام استفاده از سالینومایسین در مرحله دوم آزمایش (جدول ۳) همخوانی دارد. در واقع، به نظر می رسد بهنگام استفاده از سالینومایسین بخش عمده ای از ماده آلی هضم شده به سمت تولید گاز و اسیدهای چرب فرار توزیع شده است.

فاز تأخیر نزدیک به صفر مشاهده شده در آزمایش حاضر با توجه به ماهیت سوبسترای استفاده شده که یک جیره پروراری می باشد منطقی به نظر می رسد. افزایش خطی در فاز تأخیر بموازات افزایش دوز سالینومایسین بقدری ناچیز است که نمی توان با

اطمینان در این رابطه اظهار نظر نمود. با این‌حال، این افزایش می تواند در نتیجه شوک اولیه برخی جمعیتهای میکروبی شکمبه بواسطه حضور سالینومایسین در محیط کشت باشد. عدم تغییر در نرخ تولید گاز با افزایش دوز سالینومایسین مبین عدم تأثیر سالینومایسین بر سرعت تخمیر در زمان $T_{1/2}$ می باشد که می تواند حاکی از عدم تغییر در تعادل مجموع جمعیتهای سلولولایتیک و آمیلولایتیک باشد.

اثرات آنتی بیوتیک سالینومایسین بر شاخصهای هضم و تخمیر شکمبه

نتایج مربوط به اثرات سالینومایسین بر شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه در جدول ۳ آمده است. بر اساس این نتایج، استفاده از سالینومایسین موجب افزایش خطی و درجه دو گاز تولیدی بعد از ۲۴ ساعت (GP_{24}) گردید ($P < ۰/۰۱$) و در این میان، این مؤلفه در دوزهای ۴ تا ۱۶ میلی‌گیرم بر لیتر سالینومایسین نسبت به شاهد افزایش معنی داری داشت ($P < ۰/۰۵$). همسو با GP_{24}، میزان هضم ماده خشک و ماده آلی نیز بموازات افزایش دوز سالینومایسین در محیط کشت بطور غیر خطی افزایش یافتند ($P < ۰/۰۱$). با اینحال، فاکتور تفکیک یک روند معکوسی نسبت به هضم و تولید گاز نشان داد، بطوریکه با افزایش دوز سالینومایسین در محیط کشت، این شاخص بطور غیر خطی کاهش یافت ($P < ۰/۰۱$). در این میان، توده میکروبی تحت تأثیر سالینومایسین قرار نگرفت. همسو با تغییرات هضم و GP_2 ، غلظت کل اسیدهای چرب فرار نیز بطور غیر خطی افزایش یافت ($P < ۰/۰۱$) و بیشترین غلظت کل اسیدهای چرب فرار در بالاترین دوز سالینومایسین مشاهده گردید. غلظت آمونیاک در محیط کشت تحت تأثیر سالینومایسین قرار نگرفت ($P > ۰/۰۵$)، با این حال، غلظت آمونیاک به ازاء گرم ماده خشک هضم شده در حضور سالینومایسین بصورت خطی کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$).

همانطور که قبلا عنوان شد، افزایش تولید گاز می تواند در نتیجه بهبود هضم و تغییر الگوی تخمیر باشد. مطالعات قبلی انجام گرفته حاکی از اثرات مثبت آنتی بیوتیکها و از جمله یونوفرها بر راندمان تولید دامها می باشد(Price و همکاران، ۲۰۰۹) که بخشی از این افزایش راندمان، به بهبود هضم خوراک نسبت داده شده است (Rogers و همکاران، ۱۹۹۷).

جدول۳- اثرات سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک سالینومایسین بر برخی از فراسنجه های هضم و تخمیر شکمبه ای

فراسنجه[1]	سالینومایسین(میلی گرم بر لیتر)					SEM	P-value		
	صفر	۲	۴	۸	۱۶		تیمار	خطی	درجه دو
GP_{24}	۱۷۷/۰^{d}	۱۸۶/۷^{cd}	۱۹۶/۵^{bc}	۲۰۶ /۴^{ab}	۲۱۸/۴^{a}	۱/۹۳	۰ /۰۰۳	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱
TIVDMD	۶۷/۳^{d}	۶۷/۷^{d}	۷۰/۸^{c}	۷۳/۰^{b}	۷۴/۳^{a}	۰ /۱۷	۰ /۰۰۷۷	<۰/۰۰۱	۰ /۰۰۱
TIVOMD	۸۲/۱^{c}	۸۲/۳^{c}	۸۴/۱^{b}	۸۵/۶^{a}	۸۶/۲^{a}	۰ /۰۰۲	۰ /۰۱۰۹	<۰/۰۰۱	۰ /۰۰۲
PF	۲ /۱۱^{a}	۲ /۰۱^{ab}	۱ /۹۵^{b}	۱ /۸۹^{bc}	۱ /۸۰^{c}	۰ /۰۲۰	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱
MB	۴۸/۰	۴۴/۳	۴۲/۸	۶۲/۲	۶۴/۸	۳/۸۶	۰/۰۹۱	۰/۰۸۳	۰/۳۴۵
TVFA	۷۵/۳^{c}	۷۷/۲^{bc}	۷۸/۰^{bc}	۸۰/۴^{ab}	۸۲/۴^{a}	۰ /۵۲۷	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰ /۰۰۲
Ammonia	۹ /۰	۹ /۳	۸/۹	۸/۷	۹/۴	۰ /۲۷۳	۰ /۵۷۴	۰ /۲۹۲	۰ /۲۱۳
$Ammonia_{ddm}$	۲۶/۷	۲۷/۳	۲۵/۲	۲۳/۸	۲۵/۲	۰/۷۰۳	۰/۱۸۸	۰/۰۲۵	۰/۰۵۷

[1] GP_{24}: حجم گاز بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر بر گرم ماده آلی)، TIVDMD: میزان هضم واقعی ماده خشک آزمایشگاهی(درصد)، TIVOMD: میزان هضم واقعی ماده آلی آزمایشگاهی (درصد)، ۵- توده میکروبی (میلی‌گرم)، PF: فاکتور تفکیک (میلی‌گرم ماده آلی هضم شده به میلی‌لیتر گاز تولیدی)، MB: توده میکروبی (میلی‌گرم)، TVFA : کل اسیدهای چرب کوتاه زنجیره (میلی‌مول بر لیتر)، Ammonia: آمونیاک (میلی‌مول بر لیتر)، $Ammonia_{ddm}$: آمونیاک تولیدی به ازاء گرم ماده خشک هضم شده(میلی مول بر لیتر).

SEM: خطای استاندارد بین میانگین‌ها.

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح خطای ۰/ ۰۵ است

هرچند در شرایط استفاده از دام زنده بخشی از بهبود هضم خوراک، ناشی از کاهش نرخ عبور بوده است (Lemenager و همکاران، ۱۹۷۸)، با اینحال، مکانیسمهای دیگر یونوفرها در بهبود هضم خوراک همچنان نامشخص است. برخی از محققان بهبود هضم خوراک توسط یونووفرها را در نتیجه افزایش فعالیت و راندمان آنزیمی و ایجاد ارتباط مؤثر آنها با ذرات خوراکی می دانند(Collington و همکاران، ۱۹۹۰). لازم به ذکر است که در تمامی تحقیقات انجام گرفته در مورد تأثیر یونوفرها بر هضم خوراک، نتایج همسو نبوده است. در برخی از موارد، استفاده از یونوفرها بهبودی درهضم خوراک ایجاد نکرده است (McAllister و همکاران، ۱۹۹۴؛ Ding و همکاران، ۲۰۰۸). با این وجود، در تحقیق انجام شده توسط Sirohi و Goel (۲۰۱۲)، میزان هضم ماده خشک وآلی بهنگام استفاده از سالینومایسین در دوزهای ۱۰ و ۲۰ پی پی ام افزایش یافت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

فاکتور تفکیک بموازات افزایش دوز سالینومایسین روندی کاهشی داشت. این فاکتور در واقع شاخصی از نسبت توزیع ماده آلی هضم شده بین دو مسیر متابولیکی تخمیر (تولید اسیدهای چرب فرار و گاز) و مسیر تولید توده میکروبی می باشد (Blummel و همکاران، ۱۹۹۷b). لذا، کاهش این شاخص در آزمایش حاضر مبین تغییر الگوی تخمیر به سمت مسیر اولی در حضور سالینومایسین است. در این راستا، تغییرات میزان توده میکروبی نیز مؤید همین واقعیت است. به عبارت دیگر، با وجود افزایش میزان هضم ماده خشک و آلی که معادل افزایش میزان مواد مغذی در دسترس برای رشد بیشتر میکروب‌ها می باشد، اما در واقع این رشد مورد انتظار برای توده میکروبی دیده نشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که نیتروژن کافی، متناسب و همزمان با آزادسازی انرژی، در دسترس حداقل برخی از جمعیت-های میکروبی قرار نگرفته و انرژی آزاد شده بیشتر به سمت تولید گاز و اسیدهای چرب فرار توزیع شده است. این واقعیت را در تغییرات غلظت آمونیاک نیز می توان دید، در حقیقت با وجود افزایش میزان هضم ماده آلی، غلظت آمونیاک تغییری نکرد، و به ازای هضم هر واحد ماده آلی، غلظت آمونیاک روندی کاهشی داشت که همانطور در ادامه به آن اشاره شده، این کاهش غلظت آمونیاک در نتیجه اثر مهاری سالینومایسین بر دآمیناسیون اسیدهای آمینه می باشد. در این راستا Febel و همکاران (۲۰۰۱)گزارش دادند که استفاده از سالینومایسین موجب کاهش راندمان سنتز میکروبی گردید که مؤید فرضیه عدم استفاده بهینه از انرژی جیره به دلیل کاهش دسترسی نیتروژن می باشد.

روند تغییرات غلظت کل اسیدهای چرب فرار با روند تغییرات تولید گاز ۲۴ ساعته کاملا همسو و افزایشی بود. همانطور که قبلا اشاره شد، بخشی از افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار ناشی از بهبود هضم ماده آلی است. داده های موجود در منابع در مورد اثرات یونوفرها بر اسیدهای چرب فرار شکمبه بطور عمده معطوف بر اثر آنها بر پروفایل اسیدهای چرب فرار شکمبه می باشد که در اغلب موارد یک افزایش در نسبت غلظتی پروپیونات نسبت به استات دیده شده است (Fujita و همکاران، ۲۰۰۷؛ Bharath Kumar و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج تحقیقات انجام شده در مورد اثرات این ترکیبات، از جمله سالینومایسین بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار اغلب متفاوت می باشد، این تفاوتها اغلب ناشی از دوزهای متفاوت آنتی بیوتیک استفاده شده، جیره های مختلف و شرایط متفاوت آزمایشات (برون تنی و درون تنی) می باشند. در این رابطه، در حالیکه Olumeyan و همکاران (1986) تغییری در غلظت TVFA به هنگام استفاده از سالینومایسین در محدوده غلظتی حدود ۲ میلی گرم بر لیتر مشاهده نکردند، Nagaraja و همکاران(1987) یک افزایش در غلظت TVFA بهنگام استفاده از سالینومایسین درمحدوده غلظتی ۳ تا ۱۲ میلی گرم بر لیتر گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد. اما بخش دیگر افزایش غلظت کل اسیدهای چرب می تواند در نتیجه تغییر الگوی تخمیر به سمت افزایش تخمیر موادآلی هضم شده به گاز و اسیدهای چرب فرار باشد که با تغییرات فاکتور تفکیک هم خوانی دارد و این در نتیجه افزایش نسبت انرژی قابل تخمیر نسبت به نیتروژن قابل استفاده برای میکروب‌های شکمبه به‌هنگام استفاده از سالینومایسین می‌باشد.

با وجود افزایش میزان هضم، غلظت آمونیاک تغییری نکرد، با این وجود، مشاهده شدکه به ازای هر واحد ماده خشک هضم شده، غلظت آمونیاک روندی کاهشی خطی داشت. داده های موجود در منابع حاکی از اثرات متفاوت سالینومایسین بر غلظت آمونیاک شکمبه ای شامل اثرات افزایشی (Sirohi وGoel، ۲۰۱۲)، کاهشی (McAllister و همکاران، ۱۹۹۴؛ Febel و همکاران، ۲۰۰۱) و بدون اثر(Ding و همکاران، ۲۰۰۸) می باشد. عموما غلظت آمونیاک در شکمبه می تواند در نتیجه فعالیتهای تجزیه ای پروتئین از یک طرف و جذب آمونیاک توسط دیواره شکمبه و میکروبها تغییرکند (Nolan وDobos، ۲۰۰۵). در آزمایش حاضر، با وجود افزایش میزان هضم، عدم تغییر غلظت آمونیاک می تواند بواسطه کاهش دامیناسیون اسیدهای آمینه باشد که در منابع به اثرات مهاری سالینومایسین بر فعالیت دآمیناسیونی نسبت داده شده است (McAllister و همکاران، ۱۹۹۴؛ Kobayashi و همکاران، ۱۹۹۶؛ Mohammed و همکاران، ۲۰۰۳) . در این میان، کاهش جمعیت‌های مهم تولیدکننده آمونیاک همچون پروتوزوآها و برخی باکتریهای پروتئولایتیک می تواند منشاء اثر باشد (McAllister و همکاران، ۱۹۹۴).

اثرات آنتی بیوتیک سالینو مایسین بر جمعیت نسبی برخی از میکروارگانیسم‌های شکمبه

اثرات آنتی بیوتیک سالینومایسین بر جمعیت نسبی برخی از میکروارگانیسم‌های شکمبه در جدول ۴ ارائه شده است. بر طبق این نتایج، استفاده از سالینومایسین در سطح ۴ میلی گرم بر لیتر تاثیری بر جمعیت پروتوزوای شکمبه نداشت، با اینحال در سطح ۱۶ میلی گرم برلیتر موجب کاهش جمعیت نسبی پروتوزوآها گردید ($P < ۰/۰۵$). جمعیت نسبی قارچ‌های شکمبه تحت تأثیر سالینومایسین قرار نگرفت. همچنین جمعیت نسبی متانوژنها نیز به هنگام استفاده از سالینومایسین در محیط کشت تغییر معنی داری نداشت. با این وجود، جمعیت نسبی *فیبروباکترسوکسینوژنز* بعنوان یکی از جمعیتهای مهم هضم کننده فیبر تحت تأثیر سالینومایسین در سطح ۱۶ میلی گرم بر لیتر کاهش یافت($P < ۰/۰۵$). همچنین، *کلستریدیوم آمینوفیلوم* بعنوان یکی از جمعیتهای مهم در دامیناسیون اسیدهای آمینه، به لحاظ آماری تحت تأثیر سالینومایسین قرار نگرفت، با اینحال جمعیت نسبی این گروه بطور عددی کاهش یافت و کمترین جمعیت نسبی در بالاترین سطح سالینومایسین مشاهده شد.

تحقیقات انجام شده در مورد یونوفرها اغلب حاکی از اثرات سمی آنها بر باکتریهای گرم مثبت و پروتوزوآها بوده و حتی استفاده از یونوفرها بعنوان یکی از راهکارهای دفونه کردن (حذف پروتوزوآها) محیط شکمبه قلمداد می‌شود (Russell وStrobel، ۱۹۸۹؛ Neto و همکاران، ۲۰۰۹؛ Azzaz و همکاران، ۲۰۱۲). این موضوع در مورد سالینومایسین نیز صدق می‌کند و در معدود تحقیقات انجام شده، سالینومایسین موجب کاهش جمعیت پروتوزوآها شده است. در این راستا، Sirohi و Goel (۲۰۱۲) بیشترین کاهش جمعیت پروتوزوآ ها را در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر سالینومایسین گزارش نمودند.

جدول ٤- اثرات آنتی بیوتیک سالینومایسین بر جمعیت نسبی برخی از میکروارگانیسمهای شکمبه

جمعیت میکروبی	سالینومایسین (میلی گرم بر لیتر)			SEM	P-value
	صفر	۴	۱۶		
پروتوزوآها	۱/۰۱[a]	۰/۸۸[a]	۰/۳۳[b]	۰/۰۹۵	۰/۰۲۹
قارچها	۱/۰۲	۳/۰۹	۰/۴۵	۱/۵۱۳	۰/۷۱۹
متانوژنها	۱/۳۴	۰/۱۵	۳/۳۷	۱/۸۵۰	۰/۵۳۸
فیبروباکتر سوکسینوژنز[1]	۱/۰۱[a]	۰/۷۹[a]	۰/۲۱[b]	۰/۱۰۷	۰/۰۲۸
کلستریدیوم آمینوفیلوم[2]	۱/۸۰	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۸۶۸	۰/۳۷۱

[1] *Fibrobacter succinogenes*
[2] *Clostridium aminophilum*

SEM: خطای استاندارد بین میانگین‌ها.
P-value: سطح احتمال معنی داری
حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح خطای ۰/۰۵ است

همچنین در تحقیقی دیگر، Olumeyan و همکاران (۱۹۸۶) گزارش نمودند که تعداد پروتوزواها در گاوهای پرواری دریافت کننده روزانه ۲۲۰ میلی گرم سالینومایسین بر کیلوگرم وزن زنده دامها کاهش یافت. همچنین Bharath Kumar و همکاران (۲۰۱۰) یک کاهش وابسته به دوز در تعداد پروتوزوآها به هنگام استفاده از سالینومایسین گزارش نمودند. با این حال، تحقیقات حاکی از اثرات متفاوت یونوفرها بر جمعیت پروتوزواها بسته به خانواده آنها و نوع جیره می باشد، بطوریکه حساسیت آنها به سالینومایسین بهنگام استفاده از جیره های کنسانتره ای افزایش می باید و در این میان، انتودینیومها حساسیت بیشتری دارند (Richardson و همکاران، ۱۹۷۶). با وجود برخی اثرات منفی، کاهش جمعیت پروتوزوآها اثرات سودمند زیادی بر تخمیر شکمبه دارد که از مهمترین آنها می توان به کاهش ترن آور میکروبی و افزایش پروتئین میکروبی ورودی به دوازدهه، کاهش تولید متان و آمونیاک اشاره کرد (Eugène و همکاران، ۲۰۰۴؛ Azzaz و همکاران، ۲۰۱۲).

داده های موجود در منابع در مورد اثرات یونوفرها بر قارچهای شکمبه نیز متفاوت می باشد. در برخی از تحقیقات، یونوفرها اثرات کاهنده بر جمعیت قارچهای شکمبه داشته اند (Cann و همکاران، ۱۹۹۳)، با اینحال، در تحقیقات Miyazaki و همکاران (۱۹۷۴) و Olumeyan و همکاران (۱۹۸۶) سالینومایسین تأثیر منفی بر جمعیت قارچهای شکمبه نداشته است که با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشند، لذا به نظر می رسد که سالینومایسین حداقل در رنج غلظتی استفاده شده در تحقیق حاضر اثر منفی بر قارچهای شکمبه ندارد.

اغلب داده های موجود در منابع حاکی از اثرات کاهنده یونوفرها بر تولید متان می باشد (Russell و Strobel، ۱۹۸۹؛ Bharath Kumar و همکاران، ۲۰۱۰؛ Sirohi و Goel، ۲۰۱۲)، با این وجود، این کاهش در تولید متان اغلب به کاهش جمعیتهای تولید کننده پیش ساز متان همچون هیدروژن و فرمات نسبت داده شده است. (Russell و Strobel، ۱۹۸۹). بنابراین به نظر می رسد بیشتر متانوژنها در دوزهای رایج استفاده شده از سالینومایسین بعنوان افزودنی مقاوم باشند.

در تحقیق حاضر، جمعیت نسبی فیبروباکتر سوکسینوژنز فقط در سطح ۱۶ میلی گرم بر لیتر سالینومایسین کاهش یافت که بیانگر حساسیت وابسته به دوز این باکتری نسبت به این آنتی بیوتیک است، بطوریکه در تحقیق Olumeyan و همکاران (۱۹۸۶)، دوز ۲ میلی گرم بر لیتر تاثیری بر این باکتری نداشت، اما در تحقیق McAllister و همکاران (۱۹۹۴)، جمعیت همین باکتری در سطح ۱۲ میلی گرم بر لیتر سالینومایسین کاهش یافت که با نتایج

تحقیق حاضر همخوانی دارد. باکتری *فیبرو باکترسوکسینوژنز* یکی از مهمترین باکتریهای هضم کننده فیبر در شکمبه است (Dehority، ۲۰۰۳) که استفاده از برخی افزودنیها برای دستکاری تخمیر شکمبه ممکن است اثرات منفی بر جمعیت آن داشته باشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که گزارش کاهش تولید استات بهنگام استفاده از سالینومایسین در برخی از تحقیقات (Fujita و همکاران، ۲۰۰۷؛ Bharath Kumar و همکاران، ۲۰۱۰) ناشی از اثرات مهاری این آنتی بیوتیک بر جمعیت باکتریهای سلولولایتیک در دوزهای نسبتا بالا باشد.

همانطور که قبلا عنوان شد، تحقیقات انجام شده نشان می دهند که استفاده از یونوفرها و از جمله سالینومایسین در بیشتر مواقع موجب کاهش غلظت آمونیاک شکمبه ای شده است، با این وجود، این کاهش آمونیاک ناشی از کاهش هضم پروتئین نبوده، بلکه بواسطه کاهش فعالیت دآمیناسیون اسیدهای آمینه در شکمبه بوده است (McAllister و همکاران، ۱۹۹۴؛ Mohammed و همکاران، ۲۰۰۳). برخی از محققین کاهش تولید آمونیاک را به اثرات مهاری سالینومایسین بر برخی از باکتریهای گرم مثبت دارای فعالیت دآمیناسیونی بالا مرتبط می دانند (Kobayashi و همکاران، ۱۹۹۶). یکی از این باکتریها *کلستریدیوم آمینوفیلوم* می باشد که جزء باکتریهای با فعالیت تولید آمونیاک بالا (HAP) طبقه بندی می شود (Dehority، ۲۰۰۳). در تحقیق حاضر، هرچند جمعیت نسبی این باکتری بصورت عددی کاهش یافت، با این وجود، این کاهش به لحاظ آماری معنی دار نبود. در یک تحقیق انجام شده توسط Rychlik و Russell (۲۰۰۲) ، مشخص شد که باکتری *کلستریدیوم آمینوفیلوم* نسبت به یونوفر مونسین مقاوم می باشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که عامل اصلی کاهش غلظت آمونیاک بهنگام استفاده از یونوفرها مربوط به سایر میکروارگانیزمهای تولید کننده آمونیاک باشد (Newbold و همکاران، ۱۹۹۰)که یکی از مهمترین آنها پروتوزوآها می باشند که در آزمایش حاضر نیز جمعیت آنها کاهش یافت.

لازم به ذکر است که عمده تحقیقات انجام شده در مورد اثرات آنتی بیوتیک‌ها بر جمعیت‌های میکروبی شکمبه با استفاده از روشهای کلاسیک جداسازی و کشت میکروبی بوده و اغلب این اثرات بر جمعیتهای خالص شده میکروبهای شکمبه دیده شده است. با توجه به اثرات متقابل وسیع بین جمعیتهای میکروبی، مطالعه اثرات افزودنیها بر مخلوط جمعیت میکروبی و در محیط مایع شکمبه با استفاده از روشهای نوین همچون Real-time PCR می تواند اطلاعات واقعی‌تری از اثرات این افزودنیها بر اکوسیستم میکروبی شکمبه ارائه دهد.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از افزودنی سالینومایسین در محدوده غلظتی توصیه شده اثرات مفیدی بر فعالیت هضمی و شاخصهای تخمیر شکمبه همچون افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار دارد. با این حال، این بهبود در هضم و تخمیر شکمبه به نظر نمیرسد موجب بهبود قابل ملاحظه در پروتئین میکروبی ورودی به دوازده گردد. لذا، استفاده از سالینومایسین به همراه یک منبع نیتروژنی سهل الوصول برای میکروب‌های شکمبه همچون اوره شاید بتواند موجب بهبود راندمان سنتز پروتئین میکروبی گردد. در میان میکروارگانیسم‌های شکمبه، پروتوزوآها به نظر می‌رسد که به سالینومایسین حساس تر بوده و این امر می تواند موجب بهبود راندمان عملکرد شکمبه گردد. کاهش تولید متان و آمونیاک گزارش شده بهنگام استفاده از سالینومایسین به نظر نمیرسد در نتیجه اثرات مستقیم سالینومایسین بر متانوژنها و یا باکتریهای اختصاصی تولید کننده آمونیاک باشد. با وجود اثرات مفید سالینومایسین بر بهبود عملکرد هضمی شکمبه، استفاده از غلظتهای حدود ۱۶ پی پی ام و بالاتر آن ممکن است منجر به کاهش میزان هضم در جیره‌های علوفه‌ای گردد.

تشکرو قدر دانی

نویسندگان مقاله از آقای دکتر پویا زمانی به خاطر راهنمایی‌هایشان در تجزیه و تحلیل آماری داده های این تحقیق تشکر وقدردانی می نمایند.

منابع

AOAC. (2000). *Official methods of analysis*. 17th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

Azzaz, H., Murad, H.A. and Morsy, T.A. (2012). Utility of Ionophores for Ruminant Animals: A Review. *Asian Journal of Animal Sciences.* 9: 254-265.

Barnett, A.J.G. and Reid, R.L. (1975) . Studies on production volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen I. Volatile fatty acid production from fresh grass. *Journal of Agricultural Science.* 48: 315-321.

Bharath Kumar, M., Sriram, P., Vijayarani, K., Vijayakumar, C. and Mathuram, L.N. (2010). Effects of salinomycin and sodium fumarate on rumen fermentation using rumen simulation technique. *Indian Journal of Animal Sciences.* 80: 638-641.

Blummel, M., Makkar, H.P.S. and Becker, K. (1997a). In vitro gas production :a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 77: 24-34.

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

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.

Callaway, T.R., et al. (2003). Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Current Issues in Intestinal Microbiology.* 4: 43-51.

Cann, I.K.O., Kobayashi, Y., Onoda, A., Wakita, M. and Hoshino, S. (1993). Effects of some ionophore antibiotics and polyoxins on the growth of anaerobic rumen fungi. *Journal of Applied Bacteriology.* 74: 127-133.

Chalupa, W. (1977). Manipulating Rumen Fermentation. *Journal of Animal Science.* 45: 585-599.

Chen, G.J .and Russell, J.B. (1991). Effect of monensin and a protonophore on protein degradation, peptide accumulation, and deamination by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Animal Science.* 69: 2196-2203.

Collington, G.K., Parker, D.S. and Armstrong ,D.G. (1990). The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig. *British Journal of Nutrition.* 64: 59-70.

Cooper, R.J., Klopfenstein, T.J., Stock, R.A., Milton, C.T., Herold, D.W. and Parrott, J.C. (1999). Effects of imposed feed intake variation on acidosis and performance of finishing steers. *Journal of Animal Science.* 77: 1093-1099.

Corpet, D. (2000). Mechanism of antimicrobial growth promoters used in animal feed. *Revue de medecine veterinaire.* 151: 99-104.

Dehority, B.A. (2003). *Rumen Microbiology*. Nothingam University Press, UK.

Denman, S.E. and McSweeney, C.S. (2006). Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology.* 58: 572-582.

Denman, S.E., Tomkins, N.W. and McSweeney, C.S. (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology.* 62: 313-322.

Dibner, J.J. and Richards, J.D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science.* 84: 634-643.

Ding, J., Zhou, Z.M., Ren, L.P. and Meng, Q.X. (2008). Effect of Monensin and Live Yeast Supplementation on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Carcass Characteristics and Ruminal Fermentation Parameters in Lambs Fed Steam-flaked Corn-based Diets. *Asian-Australas J Anim Sci.* 21: 547-554.

Eugène, M., Archimède, H. and Sauvant, D. (2004). Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science.* 85: 81-97.

Febel, H., Fekete, S. and Romvari, R. (2001). Comparative investigation of salinomycin and flavophospholipol in sheep fed different composed diets. *Archiv für Tierernahrung.* 54: 225-242.

Foster, W.H. (1972). A practical evaluation of five food additives likely to be used as growth promoters in broiler rations. *British Poultry Science.* 13: 123-131.

France, J., Dhanoa, M.S., Theodorou, M.K., Lister, S.J., Davies, D.R. and Isac, D. (1993). A Model to Interpret Gas Accumulation Profiles Associated with Invitro Degradation of Ruminant Feeds. *Journal of Theoretical Biology*. 163: 99-111.

Fujita, T., Itoh, T., Majima, H. and Sano, H. (2007). Influence of dietary salinomycin on feeding-induced variations of glucose kinetics and blood volatile fatty acids and insulin concentrations in sheep fed a high-roughage diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 20: 365-372.

Groschke, A.C. and Evans, R.J. (1950). Effect of Antibiotics, Synthetic Vitamins, Vitamin B12 and an APF Supplement on Chick Growth1. *Poultry Science.* 29: 616-618.

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

Kobayashi, Y., Suda, K., Wakita, M., Baran, M. and Hoshino, S. (1996). Inhibitory Effect of the Ionophore Salinomycin on Deamination by Mixed Rumen Bacteria. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 9: 45-49.

Lemenager, R.P., Owens, F.N., Shockey, B.J., Lusby, K.S. and Totusek, R. (1978). Monensin Effects on Rumen Turnover Rate, Twenty-Four Hour VFA Pattern, Nitrogen Components and Cellulose Disappearance. *Journal of Animal Science*. 47: 255-261.

Livak ,K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25: 402-408.

Makkar, H.P.S., Blümmel, M. and Becker, K. (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *British Journal of Nutrition.* 73: 897-913.

McAllister, T.A., Moustafa, S.M.S., Cheng, K.J., Newbold, C.J., McKain, N. and Wallace, R.J. (1994). Effect of salinomycin on fermentation and nitrogen metabolism in the artificial rumen. *Canadian Journal of Animal Science*.74: 575-578.

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. *Animal Reaseach and Development.* 28: 7-55.

Miyazaki, Y., Shibuya, M., Sugawara, H., Kawaguchi, O. and Hirsoe, C. (1974). Salinomycin, a new polyether antibiotic. *Journal of Antibiotics*. 27: 814-821.

Mohammed, N., Onodera, R. and Or-Rashid, M.M. (2003). Degradation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal bacteria, protozoa and their mixture in vitro. *Amino Acids.* 24: 73-80.

Muntifering, R.B., Theurer, B. and Noon, T.H. (1981). Effects of Monensin on site and Extent of Whole Corn Digestion and Bacterial Protein Synthesis in Beef Steers2. *Journal of Animal Science.* 53: 1565-1573.

Nagaraja, T.G., Taylor, M.B., Harmon, D.L. and Boyer, J.E. (1987). In vitro lactic acid inhibition and alterations in volatile fatty acid production by antimicrobial feed additives. *Journal of Animal Science.* 65: 1064-1076.

Naujokat, C., Fuchs, D. and Opelz, G. (2010). Salinomycin in cancer: A new mission for an old agent. *Molecular Medicine Reports.* 3: 555-559.

Neto, G.B., Berndt, A., Nogueira, J.R., Demarchi, J.J.A.A. and Nogueira, J.C. (2009). Monensin and protein supplements on methane production and rumen protozoa in bovine fed low quality forage. *South African Journal of Animal Science*. 39: 280-283.

Newbold, C.J., Wallace, R.J. and McKain, N. (1990). Effects of the ionophore tetronasin on nitrogen metabolism by ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Animal Science.* 68: 1103-1109.

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

Olumeyan, D.B., Nagaraja, T.G., Miller, G.W., Frey, R.A. and Boyer, J.E. (1986). Rumen microbial changes in cattle fed diets with or without salinomycin. *Applied and Environmental Microbiology.* 51: 340-345.

Ovchinnikov, Y.A. (1979). Physico-chemical basis of ion transport through biological membranes: ionophores and ion channels. *European Journal of Biochemistry.* 94: 321-336.

Page, S.W., 2006. Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: the benefits, In: Barug, D., De Jong, J., Kies, A.K. and Verstegen, M.W.A. (eds.), Antimicrobial growth promoters, Where do we go from here?, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 19-51.

Patra, A.K. and Yu, Z. (2014). Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98: 897-905.

Price, M.M., Einkamerer, O.B., Witt, F.H.d., Greyling, J.P.C. and Fair, M.D. (2009). The effect of dietary ionophores on feedlot performance of lambs. *South African Journal of Animal Science.* 39: 141-144.

Richardson, L.F., Raun, A.P., Potter, E.L., Cooley, C.O. and Rathmacher, R.P. (1976). Effect of Monensin on Rumen Fermentation in Vitro and in Vivo. *Journal of Animal Science.* 43: 657-664.

Rogers, J.A. and Davis, C.L. (1982). Rumen volatile fatty acid production and nutrient utilization in steers fed a diet supplemented with sodium bicarbonate and monensin. *Journal of Dairy Science.* 65: 944-952.

Roura, E., Homedes, J. and Klasing, K.C. (1992). Prevention of immunologic stress contributes to the growth-permitting ability of dietary antibiotics in chicks. *Journal of Nutrition.* 122: 2383-2390.

Russell, J.B. and Strobel, H.J. (1989). Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology.* 55: 1-6.

Rychlik, J.L. and Russell, J.B. (2002). The adaptation and resistance of Clostridium aminophilum F to the butyrivibriocin-like substance of Butyrivibrio fibrisolvens JL5 and monensin. *FEMS Microbiology Letters.* 209: 93-98.

Sirohi, S.K. and Goel, N. (2012). In vitro evaluation of salinomycin addition in wheat straw based total mixed diets on rumen fermentation, methanogenesis and dry matter degradability in buffalo. *Veterinary World.* 5: 609-613.

Usagawa, T. (1992). Effects of Monensin and Salinomycin on the In Vitro Foam Stability of Sheep Rumen Fluid. *Nihon Chikusan Gakkaiho.* 63: 16-22.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science.* 74: 3583-3597.

Visek, W.J. (1970). Urease; its significance in birds and mammals. *Agricultural Science Review.* 8: 9-23.

Yen, J.T., Nienaber, J.A. and Pond, W.G. (1987). Effect of neomycin, carbadox and length of adaptation to calorimeter on performance, fasting metabolism and gastrointestinal tract of young pigs. *Journal of Animal Science*. 65: 1243-1248.

Yu, Z. and Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* 36: 808-812.