دانشگاه فردوسی مشهد
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

پایان نامه کارشناسی ارشد

تخمین فراسنجه های تجزیه پذیری پروتئین منابع مختلف خوراکی با روش های درون‌کیسه‌ای و برون تنی

جواد فلاحتی زو

استاد راهنما
دکتر محسن دانش مسگران

استادان مشاور
دکتر سید علیرضا وکیلی
دکتر عبدالمنصور طهماسبی

شهریور ۱۳۹۰

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه فردوسی مشهد

دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی

تصویب نامه

این پایان نامه با عنوان « **تخمین فراسنجه های تجزیه پذیری پروتئین منابع مختلف خوراکی با روش های درون کیسه ای و برون تنی**» توسط «**آقای جواد فلاحتی زو**» در تاریخ «۱۳۹۰/۶/۳۰» با نمره ۱۸,۲۹ و درجه ارزشیابی عالی در حضور هیات داوران با موفقیت دفاع شد.

هیات داوران:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	سمت در هیات	امضاء
۱	آقای دکتر محسن دانش‌مسگران		استاد راهنما	
۲	آقای دکتر سید علیرضا وکیلی		استاد مشاور	
۳	آقای دکتر عبدالمنصورطهماسبی		استاد مشاور	
۴	آقای دکتر رضا ولی زاده		استاد مدعو	
۵	آقای دکتر علی اصغر اسلمی نژاد		استاد مدعو	
۶	آقای دکتر احمد حسن آبادی		نماینده تحصیلات تکمیلی	

تعهد نامه

عنوان پایان‌نامه: تخمین فراسنجه های تجزیه‌پذیری پروتئین منابع مختلف خوراکی با روش های درون کیسه‌ای و برون‌تنی

اینجانب جواد فلاحتی زو دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم دامی- تغذیه دام دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی آقای دکتر محسن دانش مسگران متعهد می شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد دیگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آن‌ها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ ۱۳۹۶/۶/۳۰

نام و امضاء دانشجو

جواد فلاحتی زو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده

هدف از انجام این طرح بررسی امکان تخمین برون‌تنی تجزیه‌پذیری پروتئین خام و تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین مواد خوراکی پروتئینی در شکمبه، با استفاده از روش نوین برون‌تنی تولیدگاز بود. مواد خوراکی شامل پودرماهی،کنجاله‌ی‌سویا،دانه‌ی‌سویا،کنجاله‌ی‌کلزا، کنجاله‌ی‌آفتابگردان و یونجه‌ی خشک بود. ابتدا مایع شکمبه با کربوهیدرات‌های آسان‌تخمیرشونده کشت شد. سپس مقدار ۴۰۰ میلی گرم از نمونه‌ی خوراک با سطوح افزایش یابنده‌ی۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم از کربوهیدرات‌های آسان‌تخمیرشونده و افزودن ۹۰ میلی‌لیتر از مایع شکمبه‌ی بافری‌شده کشت داده شد. مقدار گاز تولید شده و نیتروژن‌آمونیاکی رها شده در محیط کشت در زمان‌های ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴ و ۳۰ ساعت اندازه‌گیری شدند. نتایج این آزمایش نشان‌داد که عامل‌های خوراک، زمان و اثر متقابل خوراک و زمان، تجزیه‌پذیری پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند ($p<۰/۰۱$).فرآسنجه‌های کنتیکی تجزیه‌پذیری پروتئین حاصل از روش نوین برون‌تنی تولیدگاز متفاوت از فرآسنجه‌های حاصل از روش درون‌کیسه‌ای بود. در این مطالعه خوراک‌ها به ترتیب کاهش تجزیه‌پذیری مؤثردر شکمبه، به شرح کنجاله‌ی‌سویا، دانه‌ی‌سویا، یونجه، کنجاله‌ی آفتابگردان،کنجاله‌ی‌کلزا و پودرماهی رتبه بندی شدند.کمیت ماده‌ی خشک ناپدید شده برای دانه‌ی‌سویا (داده‌های مربوط به کنجاله‌ی‌سویا اندازه‌گیری نشد) بیش‌ترین و برای پودرماهی کم‌ترین مقدار بود. این مطالعه نشان‌دادکه روش نوین برون‌تنی تولید گاز اصلاح شده، با انجام بررسی‌های بیشتر، می‌تواند به یک روش ساده، ارزان و قابل اطمینان درکنار سایر روش‌های موجود برای تخمین تجزیه‌پذیری پروتئین منابع مختلف خوراکی در شکمبه تبدیل شود.

کلید واژه ها: تجزیه‌پذیری پروتئین،شکمبه،نیتروژن‌آمونیاکی،تجزیه‌پذیری مؤثر،تولیدگاز

تقدیر و تشکر

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

سپاسگزار استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر محسن دانش مسگران که رهنمودهایشان در اجرای این تحقیق مشکلات راه را برایم هموار ساخت، می باشم.

از استادان فرزانه جناب آقایان دکتر وکیلی و دکتر طهماسبی نیز که مشاورت این پایان نامه را برعهده داشتند صمیمانه قدردانی می نمایم.

از اساتید مدعو جناب آقایان دکتر ولی زاده، دکتر اسلمی نژاد و همچنین نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر حسن آبادی تشکر می نمایم.

از تمامی اساتید محترم گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد که در طول مدت تحصیلم از محضرشان کسب فیض کرده ام صمیمانه سپاسگزارم.

از مسؤلین محترم آزمایشگاه تغذیه دام (خانم مهندس طباطبایی و آقای مهندس هاشمی عطار) و منشی محترم گروه علوم دامی (خانم ارجمند)، همچنین از مسؤلین محترم امور عمومی (آقایان مهندس مدائنی و مهندس هاتفی) و نگهبانی محترم ساختمان علوم دامی، کمال تشکر را دارم.

و در پایان از دوستان عزیز آقایان مهندس جهانی، مهندس نظری، مهندس حجت پناه، مهندس جهاندوست، مهندس مرتضایی، مهندس باغشاهی و مهندس فدایی و همه کسانی که با قدمی، قلمی، نگاهی، اندیشه ای، کلامی و حتی تبسمی روئیدن سبزه های تلاشم را مددرسان بودند، متشکرم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه ۱

فصل دوم : بررسی منابع ۷

۲-۱- اهمیت تخمین تجزیه‌پذیری پروتئین درشکمبه..... ۷

۲-۱-۱- منابع پروتئینی ۱۱

۲-۱-۲- نرخ رقت شکمبه‌ای ۱۲

۲-۱-۳-PH شکمبه‌ای و پیش ماده ۱۳

۲-۱-۴- اثرات متقابل مواد مغذی ۱۳

۲-۲- بررسی روش های تخمین تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه..... ۱۶

۲-۲-۱- روشهای درون‌تنی ۱۶

۲-۲-۲- تحقیقات درون‌کیسه‌ای..... ۱۶

۲-۲-۳- روش های برون‌تنی ۱۸

فصل سوم : مواد و روش ها ۲۷

۳-۱- محل اجرا..... ۲۷

۳-۲- مراحل اجرای طرح ۲۷

۳-۳- ساخت شیشه های مخصوص..... ۲۸

۳-۴- آسیاب کردن نمونه ها ۲۸
۳-۵- مواد خوراکی آزمایشی..... ۲۹
۳-۶- تجزیه آزمایشگاهی مواد..... ۲۹
۳-۶-۱- ماده خشک ۲۹
۳-۶-۲- مادهی خشک ناپدید شده در شیشه ها پس از ۳۰ ساعت کشت..... ۳۰
۳-۶-۳- نیتروژن..... ۳۰
۳-۶-۳-۱- مشخصات دستگاه مورد نیاز ۳۰
۳-۶-۳-۲- مواد شیمیایی مورد نیاز..... ۳۱
۳-۶-۳-۳- روش اندازه گیری ۳۱
۳-۷- تولید گاز ۳۲
۳-۷-۱- محلول های مورد نیاز..... ۳۲
۳-۷-۲- آماده سازی بزاق مصنوعی ۳۳
۳-۷-۳- ساخت بافر مک دوگال ۳۳
۳-۷-۴- گرفتن مایع شکمبه..... ۳۴
۳-۷-۵- پرانکوباسیون ۳۴
۳-۷-۶- نحوهی آماده سازی منابع پروتئینی..... ۳۵
۳-۷-۷- شرح آزمایش ۳۵

۳-۷-۸- نحوه‌ی ثبت داده ها و نمونه گیری..... ۳۷

۳-۸- نیتروژن آمونیاکی..... ۳۸

۳-۸-۱- مشخصات دستگاه مورد نیاز..... ۳۸

۳-۸-۲- مواد شیمیایی مورد نیاز ۳۸

۳-۸-۳- روش اندازه گیری..... ۳۹

۳-۹-PH..... ۴۰

۳-۹-۱- مشخصات دستگاه مورد نیاز..... ۴۰

۳-۹-۲- روش اندازه گیری..... ۴۰

۳-۱۰- محیط کشت ۴۰

۳-۱۱- محاسبه و آنالیز آماری..... ۴۱

۳-۱۱-۱- آنالیزهای بیومتریک:..... ۴۱

فصل چهارم : نتایج وبحث.....۴۳

۴-۱- مرحله‌ی پرانکوباسیون ۴۳

۴-۲- تجزیه‌ی پروتئین و تولید نیتروژن‌آمونیاکی ۴۶

۴-۲-۱- تجزیه‌پذیری پروتئین در شرایط برون‌تنی.....۴۶

۴-۲-۲- تولید نیتروژن‌آمونیاکی.....۴۸

۴-۳- فراسنجه های تجزیه‌پذیری پروتئین و تجزیه‌پذیری موثر در شرایط برون‌تنی ۵۳

۴-۴- ناپدید شدن ماده خشک ۵۷

فصل پنجم : نتیجه گیری کلی..... ۵۹

فصل ششم : منابع..... ٦١

فهرست نام‌های لاتین.....۷۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱. ترکیب(درصد بر اساس ماده خشک خوراک)مواد خوراکی آزمایشی..... ۲۹

جدول ٤ -۱. غلظت نیتروژن‌آمونیاکی مایع شکمبه قبل و بعد از پرانکوباسیون ۴۳

جدول ٤-۲. تجزیه‌پذیری پروتئین در شرایط برون‌تنی ۴۵

جدول ٤-۳.نا پدید شدن ماده‌ی خشک افزوده شده به محیط کشت پس از ۳۰ ساعت کشت.....۵۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱. شیشه های مخصوص استفاده شده در آزمایش ۲۸

شکل ۳-۲. پرانکوباسیون مایع شکمبه..... ۳۵

شکل ۳-۳. اندازه گیری نیتروژن‌آمونیاکی..... ۴۰

شکل ٤-۱. روند تولید نیتروژن‌آمونیاکی در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم کربوهیدرات ۴۹

شکل ٤-۲. روند تولید نیتروژن‌آمونیاکی در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم کربوهیدرات ۴۹

شکل ٤-۳. روند تولید نیتروژن‌آمونیاکی در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم کربوهیدرات ۵۰

شکل ٤-٤. روند تولید نیتروژن‌آمونیاکی در سطح ۴۰۰ میلی‌گرم کربوهیدرات ۵۰

شکل ٤-۵.فراسنجه aحاصل مطالعات برون‌تنی و درون‌کیسه‌ای..... ۵۵

شکل ٤-٦. فراسنجه bحاصل مطالعات برون‌تنی و درون‌کیسه‌ای ۵۵

شکل ٤-۷. فراسنجه cحاصل مطالعات برون‌تنی و درون‌کیسه‌ای..... ۵۶

شکل ٤-۸.تجزیه‌پذیری مؤثر حاصل از مطالعات برون‌تنی و درون‌کیسه‌ای ۵۶

فصل اول

۱-۱- مقدمه

تعیین مناسب نیازهای پروتئینی حیوانات به جهت حداکثر کردن تولید و به حداقل رسانیدن ورود نیتروژن به سیستم های تولید شیر بسیار حائز اهمیت است(هوهتانن و هریستو ۲۰۰۹). تخمین صحیح تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه برای فرمولاسیون دقیق جیره ها،بویژه برای گاوهای شیری پرتولید هنگامی که فرآهمی پروتئین میکروبی پاسخگوی نیازهای حیوان به پروتئین قابل متابولیسم نیست و باید جیره با خوراک های پروتئینی قابل عبور از شکمبه مکمل گردد،یک پیشنیاز می‌باشد (هدکویست و آدن ۲۰۰۶). این امر که تجزیه‌پذیری پروتئین بطور قابل ملاحظه‌ای هم در میان گروه های خوراکی و هم در درون گروه های مواد خوراکی می‌تواند تفاوت کند از مطالعات زیادی قابل فهم است و بنابراین ، تخمین تجزیه‌پذیری پروتئین در ارزشیابی خوراک ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد(ولپلاند و ویسبجرگ ۲۰۰۰).

فعالیت های دامپروری از جمله‌ی منابع برشمرده نشده‌ای هستند که به دلیل مشارکت در انتشار آمونیاک و آلودگی نیتراتی آب های سطحی و زیر زمینی ، به آلودگی نیتروژنی محیط زیست کمک میکنند(NRC ۱۹۹۳، ۲۰۰۳). خوراک های خریداری شده ، بخصوص افزودنی های پروتئینی ، یک منبع عمده‌ی مواد مغذی وارداتی و هزینه های مزرعه در مزارع پرورش گاوهای شیری هستند(کلوسنر و همکاران ۱۹۹۸). تحت چنین محدودیت های اقتصادی و زیست محیطی ای ، بهبود بهره وری استفاده از

نیتروژن وکاهش دفع نیتروژن برای حفظ پایداری مزارع گاو شیری بسیار مهم هستند و مدل های تغذیه‌ای در حال تبدیل شدن به‌یک ابزار مدیریتی مؤثر برای دستیابی به این وظایف هستند(واتیاوکس و کارگ ۲۰۰۴، دین و همکاران ۱۹۹۸).

نیاز برای ارزشیابی خصوصیات تغذیه‌ای خوراک حیوانات در سال های آینده اهمیت بیشتری خواهد داشت ، به خاطر: پیشرفت در زیست شناسی ملکولی گیاهان ،بویژه توسعه‌ی گیاهان تراریخته ، برنامه های بهبود گیاهان زراعی ، فشارهای زیست محیطی و یا اقتصادی درباره‌ی استفاده و یادسترسی به پسماندهای گیاهی و بایپروداکت‌ها(تئودور و همکاران ۱۹۹۴).تنوع وگوناگونی در ارزش تغذیه ای خوراک های بومی مناطق حاره‌ای موجب نیاز به بهبود روش های ارزیابی خوراک ها شده است (کریشنامورتی و همکاران ۱۹۹۵).

در نشخوار کنندگان ارزش پروتئین مواد خوراکی به وسیله‌ی مقدار اسیدهای آمینه‌ی از منبع پروتئین میکروبی و پروتئین جیره‌ای غیرقابل تجزیه در شکمبه که در روده‌ی باریک جذب می‌شوند ، تعیین می‌شود(پرستلاکن۱۹۹۹). روش های آزمایشگاهی سال هاست که برای توصیف خوراک‌های حیوانی ، ارزش تغذیه‌ای آن ها و تهیه‌ی داده ها برای پیش بینی عملکرد حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند. خوراک ها جهت به دست آوردن اطلاعات در مورد ارزش آن ها به عنوان یک منبع مواد مغذی مورد آنالیز قرار می‌گیرند. برخی اندازه‌گیری های شیمیایی به مدت طولانی است که برای دادن یک تصویر کلی از ترکیب مواد خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند و روش های آزمایشگاهی در سال های اخیر مورد بازبینی قرار گرفته و توسعه یافته اند. این بازبینی و شناسایی محدودیت های تکنیک های متداول با توسعه‌ی تکنیک های جدید همراه بوده است(وود و بیدو ۲۰۰۱).

سه روش متداول شامل روش های درون‌تنی ، درون‌کیسه‌ای و برون‌تنی برای ارزیابی ارزش تغذیه‌ای خوراک های حیوانات استفاده می‌شوند(افشار میرزایی و همکاران ۲۰۱۱). اندازه‌گیری های

درون‌تنی تجزیه‌پذیری مواد مغذی نیاز به حیوانات جراحی شده‌ای با کانولای شکمبه‌ای یا شیردانی و یا دوازدهه‌ای دارد (شاناک و همکاران ۲۰۰۰). افزون بر این ، مارکر های مناسبی برای محاسبه‌ی نرخ جریان شیرابه‌ی هضمی و تمایز میان مواد مغذی میکروبی و جیره‌ای جریان یافته به روده‌ی باریک مورد نیاز است (استرن و ساتر ۱۹۸۲). اندازه‌گیری سهم مواد مغذی با منشأ درون زادی دشوار است ، اما آن ها برای به دست آوردن ارزش های دقیقی از هضم باید سنجیده شوند؛ با این حال این داده ها محدود هستند. اندازه‌گیری درون‌تنی هضم مواد مغذی ؛گران ، پرکار، وقت گیر و در معرض خطا های مرتبط با استفاده از نشانگرهای مورد استفاده برای اندازه‌گیری نرخ جریان ، مارکرهای میکروبی و تفاوت های طبیعی میان حیوانات آزمایشی است (استرن و همکاران ۱۹۹۷). بعلاوه ، استفاده از دستورالعمل های تهاجمی جراحی برای تحقیقات تغذیه‌ای ،بطور کلی به نحو فزاینده‌ای ، در حال تبدیل شدن به امری غیر قابل قبول از لحاظ راحتی حیوانات، برای عموم مردم می‌باشد (شاناک و همکاران ۲۰۰۰). بنا بر این تکنیک های تهاجمی و خشن برای تخمین های روتین ارزش UDP (پروتئین جیره‌ای غیر قابل تجزیه) یک دامنه‌ی گسترده‌ای از مواد خوراکی مناسب نیستند(تامینگا ۱۹۷۹).

دستورالعمل های درون‌کیسه‌ای که اغلب بر اساس مطالعات انجام شده توسط مک دونالد و اُرسکو(۱۹۷۹) و یا مطالعات مشابه آن می‌باشند، در بسیاری از کشورها برای تخمین میزان تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین خام (CP) مواد خوراکی به خوبی پذیرفته شده است(برودریک و همکاران ۱۹۹۴ ، ،میشائیل دورا و نوزیار ۱۹۹۸). تجزیه‌پذیری پروتئین اغلب به وسیله‌ی تکنیک درون‌کیسه‌ای تخمین زده می‌شود (هدکویست و آدن ۲۰۰۶). جدای از مشکلات این روش، مانند خروج ذرات ریز از کیسه ها ،آلودگی های میکروبی و تکرار پذیری پایین (ولپلاند و ویسبجرگ ۲۰۰۰) روش درون‌کیسه‌ای قادر به تخمین تجزیه‌پذیری پروتئین های محلول نمی‌باشد. هر چند دستورالعمل های درون‌تنی و درون‌کیسه‌ای برای تخمین تجزیه‌پذیری مؤثر (به عبارت دیگر: تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای برای یک ترکیب

بوجود آمده از اندازه‌ی مخزن، نرخ تجزیه‌پذیری و نرخ عبور) پروتئین بدون اشکال نیستند (برودریک ۱۹۹۴) عموما این طور در نظر گرفته می‌شود که آن ها واقعیت را با بیشترین دقت منعکس می‌کنند. با این وجود نیاز به کار زیاد، هزینه، زمان، نا همگونی و نیاز به حیوانات فیستوله شده امکان استفاده‌ی گسترده از این دستورالعمل ها را برای اهداف آنالیزی روتین محدود می‌کند. به عبارت دیگر در یک دستورالعمل با مقبولیت گسترده برای تخمین های روتین تجزیه‌پذیری مؤثر ، باید همه‌ی این محدودیت ها به حد کافی برطرف شوند (ماتیاز و همکاران ۲۰۰۱) ویک نیاز مداوم برای روش های آزمایشگاهی ساده تر به منظور تخمین ارزش پروتئینی مواد خوراکی وجود دارد (شاناک و همکاران ۲۰۰۰).تعریف دستورالعملی که انجام آن ساده باشد، نسبتا سریع باشد، تکرارپذیر و از نظر هزینه ها مناسب باشد، برای تخمین تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین مواد خوراکی درآنالیزهای آزمایشگاهی تجاری سودمند خواهد بود (روی و همکاران ۱۹۹۱).

روش های برون‌تنی متعددی برای تعیین تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین توسعه پیدا کرده اند. یک روش دیگر برای اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای CP مستلزم تعیین تولید نیتروژن‌آمونیاکی، در مقابل ناپدید شدن خوراک است (کارلسون وهمکاران ۲۰۰۹).حال آن که، اندازه‌گیری تجزیه پذیریCP از طریق رها شدن نیتروژن‌آمونیاکی در شکمبه پیچیده است، زیرا تجزیه شدن CP خوراک و جذب نیتروژن‌آمونیاکی برای سنتز پروتئین میکروبی به صورت همزمان اتفاق می‌افتند (لنگ و نولان ۱۹۸۴). برای غلبه بر این مشکل برودریک (۱۹۸۷) یک روش برون‌تنی ممانعت کننده را ابداع کرد، که در آن هیدرازین سولفات و کرامفنیکل برای محدود کردن سنتز پروتئین میکروبی شکمبه‌ای مورد استفاده هستند. علاوه بر این تکنیک های آنزیمی می‌توانند برای اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری پروتئین استفاده شوند و پروتئین میکروبی که جدیداً شکل گرفته است از طریق استفاده از مارکرهای میکروبی مانند ایزو توپ رادیو اکتیو نیتروژن (N_{15}) می‌تواند از CP خوراک تجزیه نشده متمایز شود (کارلسون وهمکاران ۲۰۰۹