نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد ششم، شماره اول، ۱۳۹۷
http://ejrr.gau.ac.ir

تأثیر کنسانتره آردی و پلت و بافر بی‌کربنات‌سدیم و سسکویی‌سدیم‌بی‌کربنات جیره بر فعالیت برخی از آنزیم‌های هیدرولیتیک بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه، ابقای نیتروژن و خون‌شناسی در بره‌های پرواری دالاق

محمد اسدی[۱]، *عبدالحکیم توغدری[۲]، تقی قورچی[۳] و شهریار کارگر[۴]

[۱]دانش آموخته کارشناسی‌ارشد، [۲]استادیار و [۳]استاد گروه تغذیه دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: در پرواربندی گوسفندان، به‌دلیل مصرف جیره‌ای که حاوی مقدار کنسانتره زیاد و علوفه کم، بر هم خوردن تعادل محیط شکمبه امری محتمل به‌نظر می‌رسد. باتوجه به تحقیقات صورت گرفته فعالیّت آنزیم‌های شکمبه نیز با توجه به وضعیت شکمبه به‌خصوص pH تغییر می‌کند و خاصیت ذاتی بافرها مبنی‌بر بهبود شرایط محیطی شکمبه و همچنین تأثیر احتمالی شکل فیزیکی کنسانتره بر فعالیت شکمبه، تحقیق حاضر جهت بررسی تأثیر شکل فیزیکی کنسانتره (پلت و آردی) و نوع بافر جیره (بی‌کربنات‌سدیم و سسکویی‌سدیم‌بی‌کربنات) بر فعالیّت برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیّت تجزیه کاغذ صافی، پروتئاز و آلفا آمیلاز در بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه (شامل بخش جامد، خارج سلولی و درون سلولی) و ابقای نیتروژن و همچنین خون شناسی بره‌های پرواری دالاق انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی تأثیر کنسانتره آردی و پلت و بافر بی‌کربنات‌سدیم و سسکویی‌سدیم‌بی‌کربنات جیره بر فعالیت برخی از آنزیم‌های هیدرولیتیک بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه، ابقای نیتروژن و خون‌شناسی در بره‌های پرواری دالاق از ۲۸ رأس بره ی نر ۵ تا ۷ ماهه با میانگین وزن ۲/۷±۲۸ استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی به‌صورت فاکتوریل ۲*۲ و در دوره ۹۸ روزه (۱٤روز عادت‌پذیری و ۸٤ روز دوره اصلی) با ٤ تیمار و ۷ تکرار انجام شد. نمونه‌گیری از مایع شکمبه جهت اندازه‌گیری فعالیّت برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه (شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیّت تجزیه کاغذ صافی، پروتئاز و آلفا آمیلاز) در هفته پایانی دوره اصلی صورت گرفت تا آزمایش‌های مربوط به این پارامتر انجام شود. همچنین در روز ٦۰ پرواربندی ٤ رأس بره از هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب و به قفس‌های متابولیکی منتقل شدند و بعد از ۳ روز عادت‌پذیری به‌مدت ٦ روز متوالی، ادرار و مدفوع گوسفندان جمع‌آوری شد تا تعادل نیتروژن نیز با استفاده از مقادیر مصرف و دفع نیتروژن از طریق ادرار و مدفوع برآورد شد. برای تعیین فراسنجه‌های خونی روز پایانی ۳ ساعت بعد از وعده خوراک مصرفی صبح، خون‌گیری از سیاهرگ وداج گرفته شد و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. پارامترهای خونی از جمله گلبول‌های سفید خون، نوتروفیل، ائوزینوفیل، لمفوسیت و مونوسیت اندازه‌گیری شد و گلبول‌های قرمزخون،

*مسول مکاتبه: Toghdory@yahoo.com

هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط گلبول‌های قرمز، میانگین هموگلوبین سلولی و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی نیز تعیین گردید.

یافته‌ها: براساس نتایج به‌دست آمده تغییر شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر تأثیر معنی‌داری در فعالیت کل آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز (آویسلاز)، فعالیّت تجزیه کاغذ صافی، آلفا آمیلاز و پروتئاز ندارد. با وجود این که جیره تیمارهای آزمایشی در فعالیت بخش‌های مختلف آنزیم پروتئاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی اثر گذار بوده است اما این تأثیر به حدی نبوده که فعالیت کل این آنزیم‌ها را تغییردهد. در رابطه با توازن نیتروژن نیز اختلاف معنی‌داری بین نیتروژن مصرفی، مجموع نیتروژن دفعی و ابقا نیتروژن در بین گروه‌های آزمایشی یافت نشد و تنها نیتروژن دفعی از طریق مدفوع تحت تأثیر بافر سسکویی سدیم کربنات نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده بافر بی‌کربنات سدیم افزایش یافت. همچنین هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین پارامترهای خون‌شناسی بره‌ها نیز مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه مشخص نمود که شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر اختلاف معنی‌داری را در فعالیت کل آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز فعالیّت تجزیه کاغذ صافی، آلفا آمیلاز و پروتئاز و توازن نیتروژن و همچنین اختلاف معنی‌داری بین پارامترهای خون شناسی بره‌ها ندارد.

واژه‌های کلیدی: ابقای نیتروژن، بافر، شکل فیزیکی کنسانتره، فعالیت آنزیمی شکمبه، هماتولوژی

مقدمه

بسیاری از تحقیقات صورت گرفته در رابطه با شکل فیزیکی کنسانتره نشان دادند که پلت کردن کنسانتره سبب بهبود مصرف خوراک و افزایش وزن و بازده غذایی می‌شود (٤، ١٨ و ٢٥). پلت کردن جیره به‌دلیل افزایش مصرف کربوهیدرات‌های سهل الهضم، سطح دسترسی باکتری‌های شکمبه به ذرات خوراک منجر به افزایش سرعت تجزیه مواد در شکمبه و کاهش pH شکمبه می‌شود (١٠). از طرفی جیره‌های آردی باعث افزایش سرعت تخمیر در شکمبه و کاهش pH شکمبه و در نتیجه بروز اسیدوز می‌شود. در تنظیم جیره غذایی نشخوارکنندگان تأمین نیازمندی‌های حیوان (میزبان) و میکروارگانیسم‌های موجود در شکمبه هر دو اهمیت دارند. جیره هایی که اکنون مورد استفاده قرار می‌گیرند، دارای مقادیر بالای کربوهیدرات‌های محلول بوده و از نظر اندازه ذرات کوچک می‌باشند. به‌علاوه میزان مصرف غذاهای تخمیر شده در جیره‌ها نسبت به سال‌های گذشته افزایش یافته که به‌طور کلی دارای مقادیر pH پایین و مقادیر بالایی محتوای آب می‌باشند (٢٨). اندازه ذرات خوراک مصرفی و شکلی که خوراک به دام عرضه می‌شود و فرآیندهایی که برای تهیه خوراک به‌کار برده میشود عوامل اصلی تأثیرگذار بر اکولوژی شکمبه هستند (١٥ و ٣٥). استفاده از بافرهای افزودنی به خوراک یکی از ابزارهای کنترل pH شکمبه است. بافرها نسبت به تغییر در اسیدیته مقاومت ایجاد می‌کنند. بافرهای حقیقی از افزایش pH شکمبه جلوگیری میکنند. اما pH را بالاتر از حد معینی افزایش نمی‌دهند. بی‌کربنات سدیم[1]، سدیم سسکوئی کربنات[2]، سنگ آهک[3] و سدیم بنتونیت بافرهای حقیقی هستند. متداول‌ترین بافری که در صنعت پرورش دام استفاده می‌شود، بی کربنات سدیم است (٣٦). با توجه به این‌که شکل پلت خوراک باعث

1- $NaHCO_3$
2- $Na_2CO_3.2H_2O$
3- $CaCO_3$

افزایش مصرف خوراک و بالا رفتن سریع سطح انرژی می‌شود (٤، ١٨ و ٢٥) احتمال ابتلا به اختلال متابولیکی اسیدوز افزایش می‌یابد (٢٨) که با کاهش pH شکمبه، فعالیت‌های آنزیم‌های شکمبه نیز تغییر می‌یابد.

آنزیم‌های خارج سلولی مترشحه باکتری‌ها وقتی در محیط شکمبه رها میشوند، باکتری‌هایی که ترشحات آنزیمی برون سلولی ندارند نیز می‌توانند از محصولات استفاده نمایند. راحت‌ترین بخش برای نمونه‌برداری از محتویات شکمبه، بخش مایع است. باکتری‌های شناور آزاد از مواد تجزیه خوراک توسط آنزیم‌های میکروبی شکمبه باعث فراهم شدن کربن، انرژی، آمینواسیدها و ویتامین‌ها برای میزبان می‌شود. فعالیت آنزیمی شکمبه شامل آنزیم‌های تجزیه کننده پلیمرهای دیواره سلولی (سلولازها، زایلا نازها، بتاگلوکونازها، پکتینازها)، آمیلازها، پروتئازها، فیتازها و آنزیم‌های تجزیه کننده سموم گیاهی می‌باشد. تجزیه مؤثر خوراک در شکمبه نیازمند وجود کمپلکس کاملی از آنزیم‌های مختلف است و این امر اهمیت دانستن فعالیت آنزیمی در شکمبه دام را نشان می‌دهد (٣٤). برخی از باکتری‌ها از مواد مغذی محلول استفاده می‌کنند، اما این مواد به سرعت ناپدید می‌شوند. بسیاری از باکتری‌های شناور آزاد در یک فاز انتقالی به سر می‌برند. برخی باکتری‌ها متصل به خوراک هستند و در مورد آن‌ها اطلاعات کمتری وجود دارد. کمپلکس میکروبی شکمبه شامل آنزیم‌هایی است که به‌صورت همکوش عمل می‌کنند (٣٠). پلی‌ساکاریدهای موجود در جیره‌های نشخوارکنندگان توسط ترکیبی از فعالیت باکتری‌ها، پروتوزوا و قارچ‌های شکمبه به کمک آنزیم‌های هیدرولیتیک مختلف تجزیه می‌شوند. فعالیت آنزیم‌های میکروبی انعکاس کیفی از میکروب‌های دخیل در هضم خوراک است. به‌منظور بررسی فعالیت میکروبی شکمبه، تعیین وضعیت آنزیم‌های هیدرولیتیک در اکوسیستم مزبور یکی از مهمترین فراسنجه‌ها به‌شمار می‌رود، زیرا این آنزیم‌ها نشان‌دهنده میزان حضور میکروب‌های تجزیه کننده الیاف هستند (٣٣).

جمعیت میکروبی شکمبه به نوع خوراک مصرفی دام و تغییرات الگوی آنزیمی ناشی از مصرف خوراک بسیار حساس است. تغییرات میکروبی شکمبه و الگوی آنزیمی با تغییر نسبت علوفه به کنسانتره در جیره توسط کامرا و همکاران (١٧) و آگاروال و همکاران (٢) گزارش شده است. این محققین گزارش کردند که میزان فعالیت کربوکسی متیل سلولاز و زایلاناز با افزایش میزان علوفه در جیره افزایش می‌یابد. در حالی‌که هریستو و همکاران (١٤) و مارتین و مایکلت‌دورها (٢١) نشان دادند که با تغییر جیره از علوفه به سطوح بالای کنسانتره، فعالیت سلولاز و زایلاناز کاهش، ولی فعالیت آمیلاز افزایش می‌یابد. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر جیره بر فعالیت برخی از آنزیم‌های هیدرولیتیک بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه، ابقای نیتروژن و هماتولوژی در بره‌های پرواری دالاق انجام شد.

مواد و روش‌ها

دام، طرح آزمایشی و جیره‌های آزمایشی: به‌منظور انجام این آزمایش ٢٨ راس بره نر نژاد دالاق با میانگین وزن ٢٨±٢,٧ و سن ٥-٧ ماهه انتخاب شدند. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی به‌صورت فاکتوریل ٢×٢ با ٤ تیمار و ٧ تکرار انجام شد. تیمارها شامل ١- کنسانتره پلت شده+ سسکویی سدیم کربنات، ٢- کنسانتره پلت شده+ بی‌کربنات سدیم، ٣- کنسانتره آردی + سسکویی سدیم کربنات و ٤- کنسانتره آردی + بی‌کربنات سدیم بودند. دام‌ها در هر

تیمار بعد از گذراندن دوره عادت‌پذیری دو هفته‌ای، در قفس‌های انفرادی جهت شروع یک دوره پرواربندی ٨٤ روزه نگهداری شدند. جیره‌های مورد استفاده در این آزمایش بر اساس جداول انجمن ملی تحقیقات (٢٧) شامل ٢٥ درصد علوفه و ٧٥ درصد کنسانتره تهیه و تنظیم شدند و در حد اشتها در دو نوبت صبح (ساعت ٨) و عصر (ساعت ١٦) در اختیار بره‌ها قرار می‌گرفت. خوراک روزانه به‌صورت کاملا مخلوط به دام‌ها عرضه می‌شد. در تمام مدت آزمایش، حیوانات به‌طور آزاد به آب آشامیدنی تمیز و بلوک‌های مواد معدنی- ویتامینی دسترسی داشتند. ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی در جدول ١ آمده است.

جدول ١: جیره‌های آزمایشی مورد استفاده در تیمارهای مختلف و ترکیب مواد مغذی جیره.

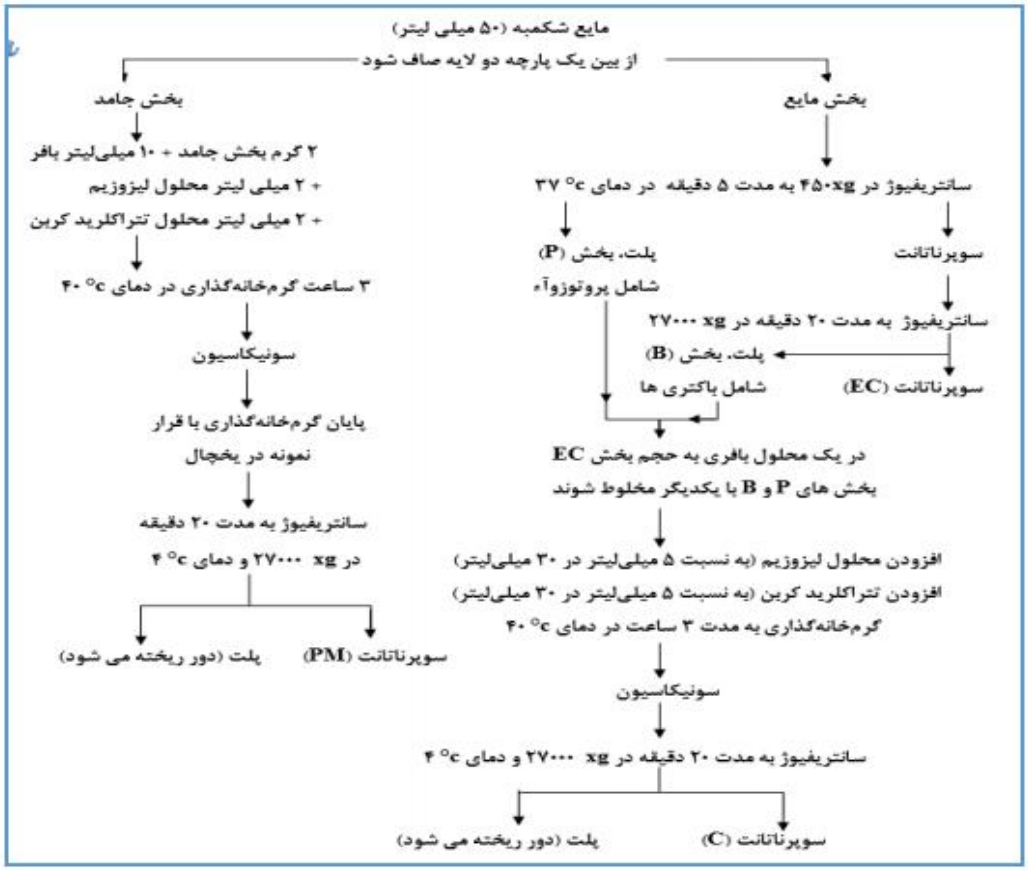
Table 1. Diets used in different treatments and nutrient composition of the diet.

اجزای جیره‌های آزمایشی (Experimental diet's components)	تیمارها (Treatments) (درصد)			
	پلت، سسکویی Pellet-sesqui	پلت، بی‌کربنات سدیم Pellet-Sodiumbicarbonate	آردی، سسکویی Mash-sesqui	آردی، بی‌کربنات سدیم Mash-Sodium bicarbonate
یونجه (Alfalfa)	25	25	25	25
دانه جو (Barely grain)	23	23	23	23
دانه ذرت (Corn grain)	26	26	26	26
کنجاله سویا (Soy meal)	6	6	6	6
سبوس گندم (Wheat bran)	11	11	11	11
تفاله چغندر قند (Beet pulp)	6	6	6	6
پودر صدف (Oyster shell)	0.5	0.5	0.5	0.5
نمک (Salt)	0.3	0.3	0.3	0.3
دی کلسیم فسفات (Dicalcium phosphate)	0.2	0.2	0.2	0.2
مکمل ویتامینی و معدنی (Minerals and vitamins supplement)	1	1	1	1
بی‌کربنات سدیم (Sodium bicarbonate)	–	1	–	1
سسکویی کربنات سدیم (Sodiumsesquicarbonate)	1	–	1	–
مواد مغذی و ترکیب شیمیایی (Nutrient and Chemical Composition)				
انرژی قابل متابولیسم، مگاکالری در کیلوگرم Metabolizable energy (mcal/kgDM)	2.62		فسفر، درصد (%) Phosphorus	0.42
پروتئین خام، درصد (%) Crude Protein	13.88		فیبر نامحلول در خنثی، درصد Neutral detergent fiber (%)	30.28
کلسیم، درصد (%) Calcium	0.66		فیبر نامحلول در شوینده اسیدی، درصد Acid detergent fiber (%)	19.48

نمونه‌گیری از شیرابه شکمبه: در هفته آخر دوره آزمایش، به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی، آلفا آمیلاز و پروتئاز نمونه‌های شیرابه شکمبه توسط لوله مری ٦ ساعت پس از خوراک‌دهی وعده صبح از

دام‌ها (٤ حیوان به ازای هر تیمار) جمع‌آوری، و بلافاصله توسط یک فلاسک عایق با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

بخش‌بندی شیرابه شکمبه: آنزیم‌های میکروبی موجود در بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه طبق روش ارائه شده توسط هریستوف و همکاران (١٤) استخراج گردید. به‌منظور بخش‌بندی آنزیم‌های مورد بررسی در شیرابه شکمبه به سه بخش جامد، خارج سلولی و درون سلولی، ابتدا شیرابه (حدود ۵۰ میلی‌لیتر) توسط دو لایه پارچه متقال صاف گردید و مواد باقیمانده روی پارچه به‌عنوان بخش جامد در نظر گرفته شد. برای جداسازی بخش‌های پروتوزوایی و باکتریایی، ابتدا شیرابه با دور ٤٥٠g به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پلت به‌دست آمده به‌عنوان بخش پروتوزوایی در نظر گرفته شد. مایع شفاف رویی (سوپرناتانت) مجدداً با دور ۲۷۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پلت به‌دست آمده در این مرحله به‌عنوان بخش باکتریایی مشخص شد. در نهایت، مایع شفاف رویی به‌عنوان منبع آنزیم‌های خارج سلولی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱: بخش‌بندی شیرابه شکمبه و استخراج آنزیم‌های هیدرولیتیک، برگرفته از آگاروال (۲۰۰۰).

PM، میکروب‌های چسبیده به مواد خوراکی در شکمبه؛ EC، بخش خارج سلولی (شیرابه شکمبه)؛ C، بخش درون سلولی (میکروب‌های معلق در مایع شکمبه)

استخراج آنزیم‌ها از بخش‌های مختلف و تخمین فعالیت آنزیمی: آنزیم‌های شکمبه‌ای مورد آزمایش در بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه طبق روش هریستو و همکاران (١٤) استخراج گردید. به‌منظور استخراج آنزیم موجود در بخش جامد شکمبه، ٢ گرم از بخش جامد در ١٠ میلی‌لیتر بافر فسفات ٠/١ مولار (با pH برابر با ٦/٨) قرار داده شد و ٢ میلی‌لیتر محلول ٠/٤ درصد لیزوزیم و ٢ میلی‌لیتر تتراکلرید کربن به آن افزوده شد. فرآیند با لیزوزیم به وسیله بن ماری التراسونیک حاوی آب یخ با نرخ پالس ٣٠ ثانیه و قدرت ٠/٥ صورت گرفت. سوسپانسیون در دمای ٣٩ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٣ ساعت انکوبه گردید و جهت متوقف نمودن واکنش در یخ قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون با دور g ٢٧٠٠٠ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ٢٠ دقیقه، سوپرناتانت حاصل به‌عنوان منبع آنزیمی برای بخش جامد شکمبه مورد استفاده قرار گرفت. برای استخراج آنزیم‌های موجود در بخش‌های پروتوزوایی و باکتریایی، پلت‌های به‌دست آمده از این دو بخش باهم مخلوط شده و به آن حجمی از بافر فسفات معادل با مایع خارج سلولی خارج شده از آن افزوده شد. سپس به سوسپانسیون حاصل از هر کدام از محلول‌های لیزوزیم ٠/٤ درصد و تتراکلرید کربن به نسبت ٢ میلی‌لیتر در ١٢ میلی‌لیتر سوسپانسیون (مشابه بخش جامد که قبلا توضیح داده شد)، مایع شفاف رویی تهیه شده به‌عنوان منبع آنزیم‌های بخش داخل سلولی مورد آزمون قرار گرفت.

محاسبه فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک در هر حیوان در هر یک از سه بخش شیرابه شکمبه طبق روش آگاروال (١) محاسبه گردید. برای تخمین فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، مخلوط واکنش شامل ١ میلی‌لیتر بافر فسفات ٠/١ مولار (با pH برابر با ٦/٨)، ٠/٥ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ٠/٥ میلی‌لیتر کربوکسی متیل سلولز ١ درصد (به‌عنوان سوبسترا) بود در دمای ٣٩ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت. به‌منظور محاسبه فعالیت کاغذ صافی، مخلوط واکنش شامل ١ میلی‌لیتر بافر فسفات ٠/١ مولار (با pH برابر با ٦/٨)، ١ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ٠/٥ گرم کاغذ صافی واتمن شماره ١ (به‌عنوان سوبسترا)، در دمای ٣٩ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١ ساعت انکوبه گردید. جهت اندازه‌گیری فعالیت آلفا آمیلاز، مخلوط واکنش محتوی ١ میلی‌لیتر بافر فسفات ٠/١ مولار (با pH برابر با ٦/٨)، ٠/٥ میلی‌لیتر محلول نشاسته ١ درصد (به‌عنوان سوبسترا) در دمای ٣٩ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٣٠ دقیقه انکوبه گردید. در همه آزمون‌های مذکور، واکنش با افزودن ٣ میلی‌لیتر محلول دی نیتروسالیسیلیک اسید متوقف گردید. گلوکز آزاد شده در اثر فعالیّت هر یک از آنزیم‌های مورد آزمون بر اساس روش میلر (٢٢) تخمین زده شد. فعالیّت‌های آنزیمی بر اساس این فرض که یک واحد آنزیم توانایی تولید ١ میکرو مول گلوکز آزاد شده در هر ساعت در هر میلی‌لیتر از مایع شکمبه را تحت شرایط مخلوط واکنش دارد محاسبه گردید. برای تخمین فعالیت پروتئازهای شیرابه شکمبه (میکروگرم پروتئین هیدرولیز شده در ساعت)، مخلوط واکنش شامل ١ میلی‌لیتر بافرفسفات ٠/١ مولار (با pH برابر با ٦/٨)، ٠/٢٥ میلی‌لیتر محلول کازئین (٢/٥ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود و در دمای ٣٩ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢ ساعت انکوبه گردید. پس از متوقف نمودن واکنش با افزودن تری کلرواستیک اسید (٢٠٠ میلی‌لیتر در لیتر)، پروتئین طبق روش لوری و همکاران (٢٠) تخمین زده شد.

محاسبه ابقاء نیتروژن: در روز ٦٠ آزمایش، ٤ راس گوسفند از هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب شد و

به‌مدت ٦ روز، هر روز قبل از خوراک‌دهی وعده صبح میزان کل مدفوع هر دام جمع‌آوری و توزین شد و سپس یک نمونه ۱۰۰ گرمی از آن (۱۲) جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین خام گرفته شد. همچنین، در این مدت میزان ادرار روزانه هر حیوان در ظرف‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱۰ درصد جمع‌آوری گردید و ۱۰ درصد از حجم کلی آن به آزمایشگاه منتقل شد. مقدار نیتروژن ابقاء شده ظاهری از اختلاف نیتروژن مصرفی و نیتروژن دفعی (مجموع نیتروژن دفع شده از طریق مدفوع و ادرار) تعیین گردید.

اندازه‌گیری متابولیت بیوشیمیایی خون: برای تعیین فراسنجه‌های خونی روز پایانی ۳ ساعت بعد از وعده خوراک مصرفی صبح، تقریبا ۵ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ وداج گرفته شد و ۳ میلی‌لیتر آن به لوله‌های حاوی محلول اتیلن دی آمین تترابیک اسید[1] انتقال داده شد و برای آزمایش‌های هماتولوژی منظور شد و بلافاصله در داخل یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. پارامترهای خونشناختی از جمله گلبول‌های سفید خون، نوتروفیل، ائوزینوفیل، لمفوسیت و مونوسیت اندازه‌گیری شد و گلبول‌های قرمز خون، هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط گلبول‌های قرمز، میانگین هموگلوبین سلولی و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی نیز تعیین گردید.

طرح آزمایش و تجزیه آماری داده‌ها: متغیرهای آزمایش شامل دو شکل فیزیکی کنسانتره و دو نوع بافر بود. اطلاعات حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت آزمایش فاکتوریل ۲×۲ که شامل شامل دو شکل فیزیکی کنسانتره و دو نوع بافر با ٤ تیمار و ۷ تکرار می‌باشد با رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ (۳۲) تجزیه و تحلیل شدند. مدل آماری و فرضیات آزمایش به‌صورت زیر بوده و مقایسات میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام شد.

$$Y_{ij} = \mu + P_i + B_j + PB_{ij} + e_{ij}$$

در این مدل:

Y_{ij}= متغیر وابسته

μ= میانگین کل

P_i= اثر شکل فیزیکی کنسانتره

B_j= اثر نوع بافر

PB_{ij}= اثر متقابل شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر

e_{ij}= اثرات باقی مانده (خطای آزمایشی)

نتایج و بحث

تأثیر شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر بر فعالیت آنزیم‌های بخش‌های مختلف شکمبه: نتایج تأثیر جیره‌های آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک بخش‌های مختلف شکمبه در جدول ۳ و ۲ ارائه شده است. در همه آنزیم‌های مورد بررسی (شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز (آویسلاز)، فعالیّت تجزیه کاغذ صافی، آلفا آمیلاز و پروتئاز) بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در بخش جامد (وابسته به ذرات) و کمترین در بخش خارج سلولی شیرابه شکمبه مشاهده گردید. اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز و آلفا آمیلاز در بخش سلولی، بخش خارج سلولی، بخش جامد و کل (مجموع هر سه بخش) شیرابه بره‌های پرواری دریافت کننده جیره‌های آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). همچنین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در رابطه با اثر شکل فیزیکی کنسانتره در بخش خارج سلولی افزایش معنی‌داری در گروه دریافت کننده پلت

1- Ethylendiamintetraacetic acid (EDTA)

نسبت به گروه آردی را نشان داد همچنین در رابطه با اثر نوع بافر مصرفی نیز در بخش‌های سلولی و خارج سلولی، فعالیت آنزیم پروتئاز در گروه دریافت کننده بافر سسکویی‌سدیم‌بی‌کربنات نسبت به بافر بی‌کربنات‌سدیم افزایش معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). اما در رابطه با فعالیت تجزیه کاغذ صافی تنها در بخش خارج سلولی شیرابه، افزایش معنی‌داری در گروه مصرف کننده بافر سسکویی‌سدیم‌بی‌کربنات نسبت به بافر بی‌کربنات‌سدیم مشاهده شد (P<۰/۰۵) و در فعالیت سایر بخش‌ها تفاوت معنی‌داری یافت نشد (P>۰/۰۵). در میان فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی شده تنها در رابطه با آنزیم پروتئاز اثرات متقابل بین شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر وجود داشت بدین ترتیب که در بخش خارج سلولی، تیمار دریافت کننده کنسانتره آردی و بافر سدیم بیکربنات از سایر تیمارها کمترین میزان فعالیت و در بخش جامد، تیمار دریافت کننده کنسانتره پلت و بافر سدیم بیکربنات از سایر تیمارها کمترین میزان فعالیت را نشان دادند (P<۰/۰۵).

فعالیت آنزیم‌های شکمبه منعکس کننده میکروب‌هایی می‌باشد که در هضم ذرات خوراکی درگیر هستند (۲۹). آنزیم‌های تجزیه کننده فیبر شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی می‌باشند (۱). کربوکسی متیل سلولاز در تجزیه سلولزهای بی‌نظم و میکروکریستالین سلولاز در تجزیه سلولزهای با نظم درگیر می‌باشند (۲۹). فعالیت این آنزیم‌ها در سه بخش مجزا از محتویات شکمبه شامل ذرات ریز (میکروب‌های متصل به بخش ذرات شکمبه)، بخش درون سلولی (سلول‌هایی که به‌صورت آزادانه در بخش مایع از مایع شکمبه معلق هستند) و بخش خارج سلولی (آنزیم‌های موجود در بخش مایع) اندازه‌گیری می‌شوند (۱). در بین این سه بخش بیشترین فعالیت هیدرولایتیکی آنزیم‌ها مربوط به بخش میکروب‌های متصل به ذرات ریز، پس از آن آنزیم‌های درون سلولی و در نهایت آنزیم‌های خارج سلولی می‌باشد (۱). در این آزمایش فعالیت آنزیم‌های وابسته به ذرات بیشتر از حدود فعالیت آنزیم‌های دو بخش سلولی و خارج سلولی به‌دست آمد. این پاسخ می‌تواند به‌دلیل سرعت کونلیزاسیون[1] ذرات خوراکی با میکروب‌ها باشد (۱). میزان فعالیت کل به‌دست آمده از آنزیم‌های مورد بررسی در این آزمایش مشابه با میزان فعالیت کل گزارش شده توسط میرمحمدی (٢٤) در بره‌های پرواری است که فعالیت کل در آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، آلفا آمیلاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی را به‌ترتیب در دامنه ٥٢٤-٢٨٢، ٢٠٣-١٤٣، ١٦٠٢-١٢٤٢ و ٣٢٤-٢١٩ نانومول گلوکز آزاد شده در هر دقیقه گزارش نمودند. مشخص شده است که تعداد بیشتر میکروب‌های وابسته به بخش جامد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک شده و عمدتاً در هضم فیبر دخیل هستند (۷، ۸ و ۲۹). همچنین قورچی و دوستی (۱۱) گزارش کردند، میزان کل فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستال سلولاز (به‌ترتیب از راست به چپ) در مقایسه مایع شکمبه‌ای دام کشتار شده با دام فیستولایی در دامنه، ٤٤٠-١٨٥، ٥٣٧-٣١١، وابسته به ذرات ٦٠-١٧، ٢٦٨-٥٥، خارج سلولی ١٣٨-٥٦، ١٧٣-٨٤، داخل سلولی ٢٤٥-٤٨، ٢٤٩-١٦٤ (نانومول در دقیقه) بوده است. گستره میزان فعالیت سه بخش آنزیم‌های به‌دست آمده از آنزیم‌های مورد بررسی در این آزمایش متفاوت با میزان فعالیت آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز گزارش شده توسط قورچی و دوستی (۱۱) می‌باشد. این تفاوت و دامنه را میتوان به‌علت خوراک،

1- Colonization

محل نگهداری و مدیریت متفاوت دانست. به‌عبارت دیگر نوع جیره تغذیه شده به حیوانات، باعث تغییر جمعیت میکروبی و متعاقب آن تغییر در الگوی آنزیمی شده است (١٦). میزان فعالیت آنزیمی کمتر در بخش سلولی شیرابه به‌این سبب است که میکروب‌های سلولولیتیک به ذرات خوراکی متصل شده‌اند و جمعیت میکروب‌های آزاد در بخش مایع بسیار کمتر است (١ و ٢٩). حداقل غلظت آنزیم‌های تجزیه کننده الیاف در بخش خارج سلولی شیرابه شکمبه قابل انتظار بود، زیرا این آنزیم‌ها به پوشش سلولی متصل هستند و تنها مقدار کمی از آن‌ها به‌دلیل تخریب یا تجزیه مکانیکی میکروب‌های تجزیه کننده الیاف به بخش مایع سلولی آزاد می‌شود (١ و ٢٣). نتایج آزمایش حاضر مطابق با یافته‌های میرمحمدی (٢٤) در بره‌های پرواری است که فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک (شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، آلفا آمیلاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی و پروتئاز) در بخش جامد، درون سلولی و خارج سلولی شکمبه را به‌ترتیب در دامنه ٨١-٧٢، ٢١-١٤ و ٩-٦ درصد از کل فعالیت گزارش کردند. همچنین، میناتو و همکاران (٢٣) دریافتند که ٧٠-٥٠ درصد باکتری‌های شکمبه متصل به ذرات خوراک هستند. میزان فعالیت کربوکسی متیل سلولاز در بخش جامد، خارج سلولی، درون سلولی و کل شیرابه شکمبه نسبت به بخش‌های مربوطه در آنزیم میکروکریستالین سلولاز بیشتر بود. آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز بر روی بخش میانی زنجیر سلولز اثر نموده و از طریق هیدرولیز آنرا پاره می‌نماید و تولید دو زنجیر کوتاه‌تر میکند. اما میکروکریستالین سلولاز به قسمت انتهایی آزاد زنجیره حمله نموده و طی مراحل متوالی سلوبیوز را تولید می‌نماید (٩). بنابراین، افزایش فعالیت کربوکسی متیل سلولاز نسبت به میکروکریستالین سلولاز احتمالا به‌خاطر وجود سوبسترای بیشتر برای آن باشد و مطابق با یافته‌های سایر محققین است (٢٤ و ٢٩).

در رابطه با تأثیر عامل شکل فیزیکی در میزان فعالیت آنزیم‌های شکمبه‌ای در تغذیه بره‌های پرواری از کنسانتره آردی و بلوک، میرمحمدی و همکاران (٢٤) نشان دادند که عامل شکل فیزیکی موجب کاهش معنی‌داری در فعالیت کل آلفا آمیلاز و کربوکسی متیل سلولز شد. همچنین فعالیت تجزیه شدن کاغذ صافی تحت تأثیر شکل فیزیکی جیره قرار نگرفت و اثر متقابل نیز در میکروکریستالین سلولاز و پروتئاز معنی‌دار بود.

تأثیر بلوک کردن جیره بر کاهش فعالیت آلفا آمیلاز می‌تواند به سبب کاهش قدرت انتخاب در دام مرتبط باشد، در مقایسه جیره‌های با کنسانتره بالا و جیره‌های با علوفه بالا مشخص گردید کاهش نسبت علوفه به کنسانتره موجب افزایش معنی‌داری در کل فعالیت آلفا آمیلازی شمکبه می‌شود (١٣ و ٢١) که می‌توان این تأثیر را در کنسانتره‌های پلت نیز به‌صورت خفیف تر انتظار داشت. با این توجیهات می‌توان تفاوت در نتایج به‌دست آمده در این تحقیق را به نوع جیره و شرایط نگهداری دام (١٦) و همچنین زمان نمونه‌گیری از مایع شکمبه (١٩) نسبت داد. آزمایشی به‌منظور بررسی ارتباط پلی ساکاریدهای هضم شده در شکمبه با تغییرات گروه‌های باکتریایی نشان داد میکروب‌های تجزیه کننده فیبر در ٨ تا ١٢ ساعت پس از تغذیه بیشترین تعداد را دارند (١٩). تحقیقات دیگری نیز یک تأخیر مشابه را در بیان فعالیت کربوکسی متیل سلولازها از میکروب‌های متصل به ذرات گزارش نموده‌اند (٣٣ و ٣٧). با توجه به این‌که در آزمایش حاضر نمونه‌گیری از مایع شکمبه در ٦ ساعت پس از تغذیه صورت گرفته است، احتمال داده می‌شود اثر زمان نمونه‌گیری باعث تغییر جزیی در پاسخ این تحقیق شده باشد.

جدول ۲- تأثیر شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر جیره بر فعالیت آنزیم‌های شکمبه.

Table2: Effect of the physical form of the concentrate and the type of buffer of the diet on the activity of the rumen enzymes

صفت traits	آلفا آمیلاز Alpha amylase (میکرومول گلوکز آزاد شده در ساعت در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه) (Micro-molar glucose released per hour per ml of ruminal fluid)				فعالیت تجزیه کاغذ صافی Filter paper degradation activity (میکرومول گلوکز آزاد شده در ساعت در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه) (Micro-molar glucose released per hour per ml of ruminal fluid)				پروتئاز Protease (میکرومول آزوکازئین هیدرولیز شده در ساعت در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه) (Micromole of casein hydrolyzate per hour per ml of ruminal fluid)			
تیمارها Treatments	بخش سلولی Cell section	بخش خارج سلولی Extracellular section	بخش جامد Solid part	کل Total	بخش سلولی Cell section	بخش خارج سلولی Extracellular section	بخش جامد Solid part	کل Total	بخش سلولی Cell section	بخش خارج سلولی Extracellular section	بخش جامد Solid part	کل Total
شکل فیزیکی: Physical shape												
کنسانتره پلت Pellet concentrate	199	67.25	745.75	1012.25	46.25	21.75	492.37	560.25	370.37	120.47[a]	716.50	1207.50
کنسانتره آردی Mash Concentrate	195	64.48	763.62	1023	44.87	23.62	500.12	568.75	361.87	113.80[b]	723.37	1198.87
خطای استاندارد SEM	15.36	4.98	11.04	18.29	0.91	0.84	13.51	13.64	4.54	1.68	5.82	11.48
سطح احتمال P-value	0.85	0.70	0.27	0.68	0.31	0.14	0.69	0.66	0.21	0.01	0.42	0.60
نوع بافر: Type of buffer												
سسکویی Sesqui	190.25	63.81	766.87	1020.87	44.62	24.22[a]	846.12	555.00	373.75[a]	121.10[a]	720.87	1215.75
سدیم بیکربنات Sodium bicarbonate	230.75	67.92	742.5	1014.37	46.50	21.15[b]	506.37	574.00	358.50[b]	113.17[b]	719.00	1190.62
خطای استاندارد SEM	15.36	4.98	11.04	18.29	0.91	0.84	13.51	13.64	4.54	1.68	5.82	11.48
سطح احتمال P-value	0.54	0.57	0.14	0.80	0.17	0.02	0.31	0.34	0.03	0.006	0.82	0.14
اثر متقابل: Intreaction effect												
پلت سسکویی Sesqui Pellet	192.50	65.97	757.25	1016.00	45.75	22.85	483.00	551.50	377.50	121.77[a]	727.25[a]	1226.75
پلت سدیم بیکربنات Pellet Sodium	205.50	68.52	724.25	1008.50	46.75	20.65	501.75	569.00	363.25	119.17[a]	705.75[b]	1188.25
آردی سسکویی Mash Sesqui	188.00	61.65	776.5	1025.75	43.50	20.60	489.25	558.00	370.00	120.42[a]	714.50[ab]	1204.75
آردی سدیم بیکربنات Mash Sodium bicarbonate	202.00	67.32	750.75	1020.25	46.25	21.65	511.00	579.00	353.75	107.17[b]	732.25[a]	1193.00
خطای استاندارد SEM	21.73	7.05	15.62	25.87	1.30	1.19	19.10	19.30	6.43	2.38	8.32	16.24
سطح احتمال P-value	0.98	0.82	0.93	0.96	0.51	0.47	0.93	0.93	0.87	0.04	0.03	0.42

جمعیت میکروبی شکمبه به نوع خوراک مصرفی دام و تغییرات الگوی آنزیمی ناشی از مصرف خوراک بسیار حساس است. تغییرات میکروبی شکمبه و الگوی آنزیمی با تغییر نسبت علوفه به کنسانتره در جیره توسط کامرا و همکاران (۱۷) و آگاروال و همکاران (۲) گزارش شده است. این محققین گزارش کردند که میزان فعالیت کربوکسی متیل سلولاز و زایلاناز با افزایش میزان علوفه در جیره افزایش می‌یابد. در حالی‌که هریستو و همکاران (۱٤) و مارتین و مایکلت- دورهآ (۲۱) نشان دادند که با تغییر جیره از علوفه به سطوح بالای غلات، فعالیّت سلولاز و زایلاناز کاهش، ولی فعالیت آمیلاز افزایش می‌یابد.

جدول ۳: تأثیر شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر جیره بر فعالیت آنزیم‌های شکمبه.

Table 3. Effect of the physical form of the concentrate and the type of buffer of the diet on the activity of the rumen enzymes.

صفات traits تیمارها treatments	کربوکسی متیل سلولاز Carboxymethyl cellulase (میکرومول گلوکز آزاد شده در ساعت در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه) (Micro-molar glucose released per hour (per ml of ruminal fluid)				میکروکریستالین سلولاز Microcrystalline Cellulase (Avislas) (میکرومول گلوکز آزاد شده در ساعت در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه) (Micro-molar glucose released per hour per ml of ruminal fluid)			
	بخش سلولی Cell section	بخش خارج سلولی Extracellular section	بخش جامد Solid part	کل Total	بخش سلولی Cell section	بخش خارج سلولی Extracellular section	بخش جامد Solid part	کل Total
شکل فیزیکی: Physical shape								
کنسانتره پلت Pellet concentrate	44.37	29.73	375	449.12	36.25	8.85	152.37	197.5
کنسانتره آردی Mash Concentrate	42.87	28.71	367	438.62	36.2	8.83	147.37	192.37
خطای استاندارد SEM	3.98	2.63	12.41	12.96	2.11	0.50	7.31	9.72
سطح احتمال P-value	0.79	0.78	0.65	0.57	0.96	0.98	0.63	0.71
نوع بافر: Type of buffer								
سسکویی Sesqui	44.25	29.61	369.25	443.12	35.75	8.73	151.50	196.12
سدیم بیکربنات Sodium bicarbonate	43.00	28.83	372.75	444.62	36.62	8.95	148.25	193.75
خطای استاندارد SEM	3.98	2.63	12.41	12.96	2.11	0.50	7.31	9.72
سطح احتمال P-value	0.82	0.83	0.84	0.93	0.77	0.77	0.75	0.86
اثر متقابل: Interaction effect								
پلت سسکویی Sesqui Pellet	45.25	30.30	381.50	457.00	36.25	8.85	159.25	204.50
پلت سدیم بیکربنات Pellet Sodium bicarbonate	43.50	29.17	368.50	441.25	36.25	8.85	145.50	190.50
آردی سسکویی Mash Sesqui	43.25	28.92	357.00	429.25	35.25	8.62	143.75	187.75
آردی سدیم بیکربنات Mash Sodium bicarbonate	42.50	28.50	377.00	448.00	37.00	9.05	151.00	197.00
خطای استاندارد SEM	5.64	3.73	17.55	18.33	2.99	0.71	10.34	13.75
سطح احتمال P-value	0.93	0.92	0.36	0.36	0.77	0.77	0.33	0.41

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

تأثیر شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر بر ابقا ظاهری نیتروژن: اطلاعات مربوط به ابقانیتروژن در جدول ٤ آمده است. همان‌طور که نشان داده شد اختلاف معنی‌داری در نیتروژن مصرفی از طریق خوراک، نیتروژن دفعی از طریق ادرار و ابقا نیتروژن در بین تیمارهای مختلف وجود ندارد (P>٠/٠٥). تنها اختلاف معنی‌داری موجود در میزان دفع نیتروژن از طریق مدفوع، تحت تأثیر عامل بافر می‌باشد که نیتروژن دفعی مدفوع تیمارهای دریافت کننده سسکویی سدیم کربنات بیشتر از تیمارهای دریافت کننده بی‌کربنات سدیم می‌باشد (P<٠/٠٥). همچنین هیچ‌گونه اثرمتقابلی در مصرف و دفع و ابقا نیتروژن در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P<٠/٠٥). متابولیسم نیتروژن به ترکیب جیره و گونه حیوان بستگی دارد (٣٨). با توجه به این‌که محتوای جیره‌های آزمایشی تقریبا یکسان بوده است می‌توان عدم اختلاف معنی‌دار بین نیتروژن مصرفی و مجموع نیتروژن دفعی و در نتیجه ابقا نیتروژن را به این موضوع نسبت داد. همچنین در پژوهش‌های آروکی و همکاران (٣) و راگوانسی و همکاران (٢٩) نیز آمده است افزایش فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک شکمبه سبب بهبود توازن تأمین انرژی و نیتروژن در شکمبه شده که متعاقب آن رشد میکروبی، مصرف خوراک و بازدهی استفاده از مواد مغذی بهبود یافته است. در پژوهشی تأثیر دو شکل فیزیکی مش و بلوک در تغذیه بزهای بربری (٣١) و همچنین تأثیر استفاده از کود مرغی در دو شکل فیزیکی آردی و بلوک در تغذیه بره‌های پرواری (٢٤) نشان داده شد که تغییر شکل فیزیکی کنسانتره جیره تأثیر معنی‌داری بر تعادل نیتروژن در دام‌های آزمایشی ندارد، که موافق با نتایج پژوهش حاضر بود.

تأثیر شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر بر فراسنجه‌های خون‌شناسی: اطلاعات مربوط به خون‌شناسی بره‌های پرواری در جدول ٥ آمده است. همان‌طور که نشان داده شد اختلاف معنی‌داری بین پارامترهای خون‌شناختی گلبول‌های سفید خون، نوتروفیل، ائوزینوفیل، لمفوسیت و مونوسیت اندازه‌گیری شد و گلبول‌های قرمز خون، هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط گلبول‌های قرمز، میانگین هموگلوبین سلولی و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی مشاهده نشد (P>٠/٠٥). همچنین هیچ‌گونه اثرمتقابلی بین عامل نوع بافر و عامل شکل فیزیکی کنسانتره در پارامترهای خون‌شناسی وجود نداشت (P>٠/٠٥). نکته قابل ذکر این است که تمامی پارامترهای خون‌شناسی اندازه‌گیری شده در این آزمایش در حد طبیعی فیزیولوژیکی گوسفند بوده که نشان از سلامتی دام‌های پرواری تیمارهای آزمایشی دارد. دام‌های پرواری که همواره به‌دلیل مصرف بالای کنسانتره در معرض بیماری اسیدوز هستند با بروز این بیماری هماتوکریت خون آن‌ها از میزان طبیعی بالاتر می‌رود. اسیدوز ایجاد شده به‌دلیل فشار اسمزی بالا، کم آبی بافتی ممکن است غلیظ شدگی شدید خون با میزان هماتوکریت ٣٠ تا ٥٠ درصد را نشان دهد (٥). نور و همکاران، افزایش معنی‌دار هماتوکریت خون را در بز از طریق تلقیح جو به درون شکمبه گزارش نموده‌اند. با توجه به این‌که میزان طبیعی هماتوکریت در این آزمایش گزارش شده است می‌توان اثر بافرهای مورد استفاده در سلامت دام‌های این آزمایش را توجیه کرد (٢٦).

جدول ٤: توازن ظاهری نیتروژن (گرم در روز) در جیره‌های آزمایشی.

Table 4. Externally nitrogen balance (g / day) in experimental diets.

نیتروژن ابقا شده Nitrogen retention (G/DAY)	کل نیتروژن دفعی Total Nitrogen Excretion (G/DAY)	نیتروژن دفعی مدفوع faecal nitrogen excretion (G/DAY)	نیتروژن دفعی ادرار Urinary Nitrogen Excretion (G/DAY)	نیتروژن مصرفی Nitrogen Intake (G/DAY)	صفات Traits / تیمارها Treatments
					شکل فیزیکی: Physical Shape
12.85	19.21	8.88	10.32	32.06	کنسانتره پلت Pellet Concentrate
11.52	19.40	8.80	10.59	30.93	کنسانتره آردی Mash Concentrate
2.32	1.42	0.04	1.45	1.67	خطای استاندارد SEM
0.69	0.92	0.26	0.89	0.64	سطح احتمال P-Value
					نوع بافر: Type of Buffer
12.49	18.96	8.93[A]	10.02	31.45	سسکویی Sesqui
11.88	19.65	8.76[B]	10.89	31.54	سدیم بیکربنات Sodium Bicarbonate
2.32	1.42	0.04	1.45	1.67	خطای استاندارد SEM
0.85	0.73	0.03	0.68	0.96	سطح احتمال P-Value
					اثر متقابل: Interaction Effect
12.35	19.72	9.03	10.69	32.06	پلت سسکویی Sesqui Pellet
13.35	18.70	8.74	9.96	32.06	پلت سدیم بیکربنات Pellet Sodium Bicarbonate
12.63	18.20	8.83	9.36	30.83	آردی سسکویی Mash Sesqui
10.42	20.60	8.78	11.82	31.02	آردی سدیم بیکربنات Mash Sodium Bicarbonate
3.28	2.01	0.06	2.06	2.36	خطای استاندارد SEM
0.63	0.42	0.12	0.46	0.96	سطح احتمال P-Value

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول ٥: تأثیر شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر جیره بر خون‌شناسی بره‌های پرواری.

Table 5. Effect of concentrate physical form and type of buffer on hematology of fattening lambs.

صفات TRAITS / تیمارها TREATMENTS	گلبول سفید WBC	نوتروفیل NEUT	ائوزینوفیل EOS	لمفوسیت LYM	مونوسیت MON	گلبول قرمز RBC	هموگلوبین HGB	هماتوکریت HCT	حجم متوسط گلبول‌های قرمز MCV	میانگین هموگلوبین سلولی MCH	میانگین غلظت هموگلوبین سلولی MCHC
شکل فیزیکی: PHYSICAL SHAPE											
کنسانتره پلت PELLET CONCENTRATE	9.12	37.02	2.37	56.75	3.00	5.62	9.75	20.65	33.12	15.12	47.00
کنسانتره آردی MASH CONCENTRATE	9.00	41.00	2.00	55.37	3.12	5.87	10.00	21.00	35.12	15.00	46.87
خطای استاندارد SEM	0.60	3.02	0.47	2.83	0.48	0.21	0.56	1.05	1.05	0.58	1.33
سطح احتمال P-VALUE	0.88	0.39	0.58	0.73	0.85	0.43	0.76	0.80	0.20	0.88	0.94
نوع بافر : TYPE OF BUFFER											
سسکویی SESQUI	8.75	41.50	2.12	53.25	3.00	5.37^{B}	10.00	21.25	34.62	15.21	46.75
سدیم بیکربنات SODIUM BICARBONATE	9.37	36.75	2.25	58.87	3.12	6.12^{A}	9.75	20.37	33.62	14.87	47.12
خطای استاندارد SEM	0.60	3.02	0.47	2.83	0.48	0.21	0.56	1.05	1.05	0.58	1.33
سطح احتمال P-VALUE	0.47	0.28	0.85	0.18	0.85	0.03	0.76	0.56	0.51	0.65	0.84
اثر متقابل: INTREACTION EFFECT											
پلت سسکویی SESQUI PELLET	8.75	39.50	2.25	53.00	2.75	5.25	9.75	22.00	33.75	15.00	46.75
پلت سدیم بیکربنات PELLET SODIUM BICARBONATE	9.5	35.00	2.50	60.50	3.25	6.00	9.75	19.25	32.50	15.25	47.25
آردی سسکویی MASH SESQUI	8.75	43.50	2.00	53.50	3.25	5.50	10.25	20.50	35.50	15.50	46.75
آردی سدیم بیکربنات MASH SODIUM BICARBONATE	9.25	38.50	2.00	57.25	3.00	6.25	9.75	21.50	34.75	14.50	47
خطای استاندارد SEM	0.85	4.25	0.67	4.00	0.68	0.3	0.80	1.49	1.49	0.82	1.88
سطح احتمال P-VALUE	0.88	0.95	0.85	0.64	0.59	0.95	0.76	0.23	0.87	0.46	0.94

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<٠/٠٥).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی این آزمایش نشان داد که شکل فیزیکی کنسانتره و نوع بافر اختلاف معنی‌داری را در فعالیت کل آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی، آلفا آمیلاز و پروتئاز ندارد. با وجود این که جیره تیمارهای آزمایشی در فعالیت بخش‌های مختلف آنزیم پروتئاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی اثر گذار بوده است اما این تأثیر به حدی نبوده که فعالیت کل این آنزیم‌ها را تغییر دهد. در رابطه با توازن نیتروژن نیز اختلاف معنی‌داری بین نیتروژن مصرفی، مجموع نیتروژن دفعی و ابقا نیتروژن در بین گروه‌های آزمایشی یافت نشد و تنها نیتروژن دفعی از طریق مدفوع تحت تأثیر بافر سسکویی سدیم کربنات نسبت به گروه‌های دریافت کننده بافر بی کربنات سدیم افزایش یافت. همچنین هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین پارامترهای خون‌شناسی بره‌ها نیز مشاهده نشد.

منابع

1. Agarwal, N. 2000. Estimation of fibre degrading enzyme. In: Feed Microbiology (eds Chaudhary, L.C., Agarwal, N., Kamra, D.N., and Agarwal D.K.,). CAS Animal Nutrition, IVRI, Izatnagar, India. 283–290.
2. Agarwal, N., Saxena, J., Saha, S., Chaudhary, L.C., and Kamra, D.N. 2004. Changes in fermentation characteristics, microbial populations and enzyme profile in the rumen of buffaloes affected by roughage level in the diet. Bubalusbubal. 111: 81–90.
3. Arroquy, J.I., Cochran, R.C., Villarreal, M., Wickersham, T.A., Llelwellyn, D.A., Titgemeyer, E.C., Nagaraja, T.G., Johnoson, D.E., and Gnad, D. 2004. Effect of level of rumen degradable protein and type of supplemental non-fibre carbohydrate on intake and digestion of low quality hay by beef cattle. Journal Of Animal Feed Science and Technology. 115: 83-99.
4. Babker, I.A., Mukhtar, A.M.S., and Khidir, E.L. 2009. Feedlot performance of Baggara Bulls fed Pelleted and Unpelleted baggase Based Diets. Pakistan Journal of Nutrition. 8: 384-387.
5. Cao, G.R., English, P.B., Filippish, L.J., and Inglis, S. 1987. Experimental induced lactic acidosis in goat. Australian Veterinary Journal. 64(12): 367-370.
6. Chen, X.B., and Gomes, J.M. 1995. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives an overview of the technical details. International feed resources unit, Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen AB2 9SB, UK.
7. Cheng, K.J., and McAllister, T.A. 1997. Comport mentation in the rumen. In The rumen microbial ecosystem (eds PN Hobson and CS Stewart). Chapman and Hall, London. 492-522.
8. Cheng, K.J., Stewart, C.S., Dinsdate, D., and Cosertor, J.W. 1984. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant walls. Journal Of Animal Feed Science and Technology. 10: 93-120.
9. Danesh Mesdaran, M., Tahmasbi, A.M., and Vakili, A.R. 2011. Digestion and Metabolism in Ruminants. Ferdowsi University of Mashhad Publication, 261. (In Persian)
10. Faichney, G.J., Teleki, E., and Brown, G.H. 2004. Effect of physical form of lucene hay on digestion and rate of passage in sheep. Australian Journal of Agricultural Research. 55: 1253-1262.
11. Ghoorchi, T., and Dosti, F. 1394. Evaluation of the activity of cellulase enzymes in rumen fluid in fattening lambs slaughtered in slaughterhouse. Final report of Gorgan University of Agricultur and Natural Resources. 33. (In Persian)
12. Harris, L.E. 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals. Vol. 1. Utah State University, Logon, Utah. USA.

13. Hristov, A.N., Ivan, M., Rode, L.M., and McAllister, T.A. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. Journal of Animal Science. 79: 515–524.
14. Hristov, A.N., McAllister, T.A., and Cheng, K.J. 1999. Effect of diet, digesta processing, freezing and extraction procedure on some polysaccharide degrading activities of ruminal contents. Canadian Journal of Animal Science. 79: 73-81.
15. Hungate, R.E. 1996. The Rumen and its Microbes. Academic Press, New Yourk, USA. 533.
16. Kamra, D.N., Agarwal, N., and McAllister, T.A. 2010. Screening for compounds enhancing fiber degradation. In: Vercoe P.E, Makkar H.P.S. Schlink A.C. (Eds.), In vitro Screening of Plant Resources for Extranutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, the Netherlands. 85–107.
17. Kamra, D.N., Saha, S., Bhatt, N., Chaudhary, L.C., and Agarwal, N. 2003. Effect of diet one nzyme profile, biochemical changes and in sacco degradability of feeds in the rumen of buffalo. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 16: 374–379.
18. Karimizadeh, E., Chaji, M., and Mohammadabadi, T. 2017. The effects of Journal physical form of diet on nutrient digestibility. Rumen fermentation,rumination, growth performance and protozoa population of finishing lambs. Journal Of Animal Nutrition. 3(2): 139-144.
19. Leedle, J.A.Z., Barsuhn, I., and Hespell, R.B. 1986. Postprandial trends in estimated ruminal digesta polysaccharides and their relation to changes in bacterial groups and rumen fluid characteristics. Journal of Animal Science. 62: 789-803.
20. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Pholin-phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 262-275.
21. Martin, C., and Michalet-Doreau, B. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. Journal of Agricultural Science. 67: 407–413.
22. Miller, J.L. 1959. Modified DNS method for reducing sugars. Analytical Chemistry. 31: 426–429.
23. Minato, H., Endo, A., Higuchi, M., Ootomo, Y., and Uemura, T. 1966. Ecological treatise on the rumen fermentation.1.The fractionation of bacteria attached to the rumen digesta solids. Journal of General and Applied Microbiology. 12: 39-53.
24. Mirmohammadi, D. 2013. Effect of physical form in diets with and without broiler litter on the performance of fattening lambs. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University. (In Persian)
25. Munasik, C., Sutrisno, I., Anwar, S., and Prayitno, S. 2013. Physical Characteristics of Pressed Complete Feed for Dairy Cattle. International Journal of Science and engine. 4: 61-65.
26. Nour, M.S.M., Abusamara, M.T., and Hago, B.E.D. 1999. Experimentally induced lactic acidosis in Nubian goats clinical. Biochemical and Pathological Investigation. Journal Of Small Ruminant . 31(1): 7-17.
27. NRC. 2007. National Research Council: Nutrient Requirements of Small Ruminants, Sheep, Goats, Cervide and New York Camelids. National Academy of Science, Washington, D.C.
28. Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J., and Gill, D.R. 1998. Acidosis in cattle: A Review. Journal of Animal Science. 76: 275-286.
29. Raghuvansi, S.K.S., Prasad, R., Tripathi, M.K., Mishra, A.S., Chaturvedi, O.H., Mishra, A. K., Saraswat, B.L., and Jakhmola, R.C. 2007. Effect of complete feed blocks or grazing and supplementation of lambs on performance, nutrient utilisation, rumen fermentation and rumen microbial enzymes. Journal Of Animal Science. 1: 221–226.
30. Russel, J.B. 2002. Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition. J.B. Russell Publ. Co., Ithaca, NY.
31. Samanta, A.K., Singh, K.K., Das, M.M., Maity, S.B., and Kundu, S.S. 2003. Effect of complete feed block on nutrient utilisation and rumen fermentation in Barbari goats. Journal Of Small Ruminant. 48: 95–102.
32. SAS. 2002. Statistical Analysis System: Users Guide, Statistics, version 9.1. SAS Institute. Carry, N.C., USA.

33. Silva, A.T., Wallace, R.J., and Arskov, E.R. 1987. Use of particle-bound microbial activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. Brirish Journal of Nutrition. 57: 407-415.
34. Sinclair, L.A., Garnsworthy, P.C., Newbold, J.R., and Buttery, P.J. 1993. Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on rumen fermentation and microbial protein synthesis in the sheep. Journal of Agricultural Science. 120: 251-263.
35. Wahdo, D.R., and Smith, L.W. 1972. Model of cellulose disappearance from the rumen. Journal of Dairy Science. 55: 125-129.
36. Wenping, H., and Murphy, M.R. 2004. Statistical evaluation of early and mid-lactation dairy cow responses to dietary sodium bicarbonate addition. Journal Of Animal Feed Science and Technology. 119: 43-54.
37. Williams, A.G., Withers, S.E., and Strachan, N.H. 1989. Postprandial variations in the activity of polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the digesta solids and liquor fractions of rumen contents. Journal Of Applied Bacteriology. 66: 15-26.
38. Woodward, A., and Reed, J.D. 1997. Nitrogen metabolism of sheep and goats consuming Acacia brevispica and Sesbania sesban. Journal of Animal Science. 75: 1130-1139.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 6(1), 2018
http://ejrr.gau.ac.ir

The effect of physical form of concentrate and buffer type on the activity of some hydrolytic enzymes of different segments of rumen fluid, nitrogen Retention and hematology in Dalagh fattening lambs

M. Asadi[1], *A. Toghdary[2], T. Ghoorchi[3] and Sh. Kargar[4]
[1]M.Sc. graduated, [2]Assistant Prof., and [3]Professor, Dept. of Animal and Poultry Nutrition, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[4]Assistant Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University
Received: 03/23/2018; Accepted: 06/17/2018

Abstract

Background and objectives: In fattening lambs, due to highly concentrated diets and low forage, disruption of balance in ruminal environment is possible. According to researches, the activity of rumen enzymes also varies with regard to the rumen status, especially pH, and the inherent nature of buffers in improving the rumen's environmental conditions, as well as the possible effect of the physical form of the concentrate on ruminal fermentation. The present study aimed to investigate the effect of the physical form of the concentrate (pellet and mash) and buffer type of ration (bicarbonate sodium and sesquisodium carbonate) on the activity of some ruminal hydrolytic enzymes including carboxymethyl cellulose, microcrystalline cellulose, filter paper degrading activity, protease and alpha amylase in different segments of rumen fluid (including solid, extracellular and intracellular sections) and nitrogen retention and blood hematology of Dalagh fattening lambs.

Materials and methods: In order to investigate the effect of the physical form of the concentrate and the buffer type of diet on the activity of some hydrolytic ruminal enzymes, nitrogen retention and blood hematology in Dalagh fattening lambs, 28 male lambs in 6±1.2 months of age and average weight of 28 ± 2.7 were used. This experiment was conducted in a completely randomized design with a 2 × 2 factorial arrangement and a 98-day period (14 days of adaptation and 84 days of the main period) with four treatments and seven replications. Rumen fluid sampling was performed to measure the activity of some hydrolytic enzymes during the final week of the experiment. Also, on day 60, four lambs were randomly selected from each treatment and transferred to metabolic cages. After three days of adaptation, urine and faces were collected, daily for six days. The nitrogen balance was measured using nitrogen consumption and excretion. It was estimated through urine and faces. To determine the blood parameters, in final day, 3 hours after the morning feeding, blood was taken from the vein and immediately transferred to the laboratory. Blood parameters such as white blood cells, neutrophils, eosinophil's, lymphocytes and monocytes were measured and red blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean blood cell counts, mean hemoglobin, and mean hemoglobin concentration were also determined.

Results: Based on the results, change in physical form of the concentrate and the buffer type did not have a significant effect on the activity of the total carboxymethyl cellulose enzymes, microcrystalline cellulase, and activity of filter paper decomposition, alpha amylase and protease. Although the experimental diets have been effective in the activity of various

*Corresponding author; toghdory@yahoo.com

segments protease enzymes and filter paper decomposition activity. This effect has not been sufficient to alter the overall activity of these enzymes. In relation to nitrogen balance, no significant difference was found between nitrogen intake, total nitrogen and nitrogen retention in experimental groups, and only excreted nitrogen through feces under the influence of sesquisodium carbonate buffer increased compared to those receiving sodium bicarbonate buffer. Also, no significant differences were found between the hematological parameters of the lambs.

Conclusion: This study showed that the physical form of the concentrate and the buffer type had no significant effect in the activity of the total carboxymethyl cellulose enzymes, microcrystalline cellulose, activity of filter paper decomposition, alpha amylase and protease and nitrogen balance, furthermore, there was no difference between hematological parameters.

Keywords: Nitrogen retention, Buffer, Physical form of concentrate, Enzyme activity of rumen, Hematology