Vol 25, No. 4, Winter 2023

University of Tehran Press

Journal of Animal Production

Online ISSN: 2382-994X

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

The effect of different zinc sources on *in vitro* ruminal microbial populations, hydrolytic enzymes and fermentation products in sheep

Mostafa Akbari Alaei[1] | Javad Rezaei[2]✉ | Yousef Rouzbehan[3]

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: mostafa.akbarialaei@modares.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: rezaei.j@modares.ac.ir
3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: rozbeh_y@modares.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 10 September 2023
Received in revised form
20 November 2023
Accepted 22 November 2023
Published online
25 December 2023

Keywords:
Enzyme activity
In vitro fermentation
Microbial population
Zinc supplement

ABSTRACT

Introduction: Zinc is vital for proper microbial activity and is expected to affect rumen microorganisms and enzymes. Animal zinc requirements are usually provided by inorganic salts, but their bioavailability is low. By producing organic and nano zinc sources, it may be possible to reduce the interaction of zinc with other elements and increase its biological activity and effectiveness on rumen microbes. Despite various animal studies, the comparative effect of different zinc sources on ruminal microbes and hydrolytic enzymes has not been well investigated. In this research, it was assumed that organic and nano zinc sources may be used more effectively by rumen microbes, compared to inorganic zinc. As a result, they may improve enzymatic activity and fermentation.This study was conducted to compare the effect of different zinc sources on *in vitro* microbial populations, hydrolytic enzymes, antioxidant capacity and fermentation products in sheep.

Material and Methods: The treatments were a diet without zinc supplement (control) and diets containing $ZnSO_4$, ZnO, nano-ZnO or Zn-methionine. The zinc concentration in diets without or with zinc supplements was 27.1 and 57.1 mg/kg DM, respectively. The 24 and 72-h gas tests were done with three replicates and two runs, where microbial populations, enzymatic activity, gas production, organic matter digestibility (OMD), metabolizable energy (ME), methane, truly-degraded substrate (TDS), microbial biomass production (MBP), partitioning factor (PF), antioxidant capacity, pH, Ammonia-N and volatile fatty acids (VFA) were determined. Data were analyzed using GLM procedure of SAS in a completely randomized design.

Results and Discussion: Total proteolytic bacteria and protease activity in 24 and 72-h incubations decreased ($P<0.05$) by adding all zinc supplements to the diet. This reduction may be related to the selective negative effect of zinc salts on certain groups of proteolytic bacteria. The use of $ZnSO_4$, ZnO and Zn-methionine led to an increase in alpha-amylase activity in both incubation times ($P<0.05$). The dietary zinc supplementation appears to selectively improve conditions for amylolytic activity (contrary to proteolysis). This finding was consistent with the increase in TDS and the decrease in acetate: propionate. The increased alpha-amylase activity was also consistent with the relative decrease in ruminal pH because reducing pH in the normal range improves conditions for activity of amylolytic bacteria. By including zinc supplements in diet, a tendency to reduce the 24-h protozoa number was observed. The use of $ZnSO_4$, ZnO and Zn-methionine increased gas production, OMD, ME and TDS, compared to control ($P<0.05$), due to the improvement of alpha-amylase activity and microbe-feed attachment. Compared to control, all zinc supplements decreased 24-h methane ($P<0.05$), probably owing to the relative reduction of protozoa, the increase in propionate percentage and a shift of hydrogen towards propionate instead of methane. Treatments had no effect on cellulolytic bacteria, carboxymethyl-cellulase, microcrystalline-cellulase, filter paper-degrading activity, antioxidant capacity, MBP and PF. Ammonia-N concentration decreased with dietary inclusion of organic and inorganic zinc sources, compared to control ($P<0.05$), due to the decrease in ruminal proteolytic activity (lower proteolytic bacteria and protease). Dietary inclusion of inorganic and organic zinc supplements increased total VFA concentration in 24 and 72-h incubations ($P<0.05$), because of the higher TDS and amylolytic activity, but decreased acetate: propionate ($P<0.05$). On the other hand, adding nano-ZnO had no considerable positive or negative effects on *in vitro* fermentation variables.

Conclusion: Addition of $ZnSO_4$, ZnO and Zn-methionine in the diet (30 mg Zn/kg DM) is recommended with the aim of improving ruminal alpha-amylase activity and diet digestibility and reducing proteolytic activity, ammonia and methane, but feeding nano-ZnO is not recommended. More experiments should be conducted to clarify the effect of different zinc sources on microbial populations and enzymatic activity in different dietary conditions.

Cite this article: Akbari Alaei, M., Rezaei, J., & Rouzbehan, Y. (2023). The effect of different zinc sources on in vitro ruminal microbial populations, hydrolytic enzymes and fermentation products in sheep. *Journal of Animal Production*, 25 (4), 357-373. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2023.365159.623757

© The Author(s). Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2023.365159.623757

دوره بیست و پنجم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۲

انتشارات دانشگاه تهران

تولیدات دامی

شاپا الکترونیکی: ۲۳۸۲x-۹۹۴

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

تأثیر منابع مختلف روی بر جمعیت‌های میکروبی، آنزیم‌های هیدرولیتیک و فرآورده‌های تخمیر برون‌تنی شکمبه‌ای در گوسفند

مصطفی اکبری علایی[۱] | جواد رضائی[۲]✉ | یوسف روزبهان[۳]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: mostafa.akbarialaei@modares.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: rezaei.j@modares.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: rozbeh_y@modares.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۰/۰۴

کلیدواژه‌ها:

تخمیر برون‌تنی

جمعیت میکروبی

فعالیت آنزیمی

منبع روی

چکیده

این پژوهش به‌منظور مقایسه تأثیر منابع مختلف روی بر جمعیت‌های میکروبی، آنزیم‌های هیدرولیتیک و فرآورده‌های تخمیر برون‌تنی شکمبه گوسفند اجرا شد. پنج جیرهٔ بدون مکمل روی (شاهد) یا حاوی سولفات‌روی، اکسید روی، نانواکسید روی و روی–متیونین ارزیابی شدند. آزمون‌های گاز ۲۴ و ۷۲ ساعته در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و جمعیت‌های میکروبی، آنزیم‌های هیدرولیتیک، متان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هضم‌پذیری ماده آلی (OMD)، انرژی قابل سوخت‌وساز (ME)، سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی (TDS)، توده میکروبی، ضریب تفکیک‌پذیری (PF) و اسیدهای چرب فرّار (VFA) تعیین گردیدند. تعداد کل باکتری‌های پروتئولیتیک و فعالیت پروتئاز در اثر مصرف منابع آلی، معدنی و نانوذرات روی کاهش یافت (P<۰/۰۵). مصرف منابع متیونین، اکسید و سولفات‌روی موجب افزایش فعالیت آلفاآمیلاز شد (P<۰/۰۵). تعداد کل پروتوزوآ در انکوباسیون ۲۴ ساعته در اثر منابع روی جیره‌ای روند کاهشی نشان داد. کل باکتری‌های سلولولیتیک، کربوکسی‌متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، توده میکروبی و PF بین تیمارها یکسان بود. مکمل‌های متیونین، اکسید و سولفات روی موجب افزایش OMD، ME، TDS و کل VFA شدند، درحالی‌که آمونیاک و نسبت استات:پروپیونات را کاهش دادند (P<۰/۰۵). تولید متان ۲۴ ساعته نیز با مصرف مکمل‌های روی کاهش یافت (P<۰/۰۵). درمجموع، افزودن مکمل‌های سولفات، اکسید و متیونین–روی به جیره (۳۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم ماده خشک) با هدف بهبود فعالیت آلفاآمیلاز و قابلیت هضم و کاهش فعالیت پروتئولیتیک، تجمع آمونیاک و متان قابل‌توصیه است، اما تغذیه نانواکسید روی توصیه نمی‌شود. پژوهش‌های بیش‌تری در مورد اثر منابع روی بر میکروب‌ها و آنزیم‌های شکمبه در شرایط جیره‌ای متفاوت نیاز است.

استناد: اکبری علایی، مصطفی؛ رضائی، جواد و روزبهان، یوسف (۱۴۰۲). تأثیر منابع مختلف روی بر جمعیت‌های میکروبی، آنزیم‌های هیدرولیتیک و فرآورده‌های تخمیر برون‌تنی شکمبه‌ای در گوسفند. *نشریه تولیدات دامی*، ۲۵ (۴)، ۳۷۳-۳۵۷. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2023.365159.623757

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

CC BY NC

۱. مقدمه

روی یکی از محدودکننده‌ترین ریزعناصر معدنی است که باید روزانه در جیره غذایی دام استفاده شود. این عنصر برای کنترل اشتها، رشد بدن، ساختمان و فعالیت هورمونی و آنزیمی، سوخت‌وساز مواد مغذی، تقسیم سلولی و سیستم ایمنی موردنیاز است (Suttle, 2022). هم‌چنین، روی جزء عناصر مهم دخیل در فعالیت مناسب میکروبی شکمبه، تخمیر و هضم می‌باشد (Eryavuz & Dehority, 2009). بنابراین، انتظار می‌رود بر گروه‌های میکروبی و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه تأثیرگذار باشد و موجب تغییر در نسبت فرآورده‌های تخمیری و بازده خوراک شود. افزودن روی به جیره، فارغ از شکل شیمیایی، در بهینه‌سازی مصرف منابع نیتروژن و کربن در شکمبه مؤثر است و می‌تواند هدرروی منابع مغذی به شکل متان و آمونیاک را کاهش دهد (Alijani *et al.*, 2020).

از سوی دیگر، رویِ موردنیاز دام با استفاده از منابع و مکمل‌های مختلفی فراهم می‌شود و علاوه بر دُز مصرف، یکی دیگر از عوامل مهم دخیل در اثرگذاریِ عنصر مذکور، شکل و ترکیب شیمیایی آن است. نیاز حیوانات معمولاً با مصرف نمک‌های معدنی (مانند اکسید و سولفات‌روی) تأمین می‌شود، اما بازده جذب روی معدنی خیلی زیاد نیست. هم‌چنین، منابع معدنی روی غالباً دارای روابط متقابل زیادی با دیگر عناصر جیره هستند، در جذب و سوخت‌وساز برخی از عناصر مداخله می‌کنند، بر تعادل سایر مواد معدنی اثرگذار هستند و درنتیجه ممکن است دفع بیش‌تری نیز داشته باشند (Suttle, 2022). این در حالی است که پیوندکردن روی با یک لیگاند آلی (ایجاد عناصر آلی) و نیز تولید نانوذرات ممکن است برهم‌کنش روی با دیگر عناصر را تغییر دهد و موجب افزایش فعالیت زیستی و بهبود جذب و زیست‌فراهمی عنصر شود. شدت اثرگذاری روی بر میکروب‌های شکمبه و بدن دام نیز ممکن است از طریق کاربرد منابع مذکور بهبود یابد (Suttle, 2022; Swain *et al.*, 2016). برای نمونه، برخی پژوهش‌گران زیست‌فراهمی نسبی منابع آلی روی را بیش از اشکال غیرآلی بیان کردند، هرچند این برتری همیشه دیده نشده است (Suttle, 2022). هم‌چنین، در برخی پژوهش‌ها، زیست‌فراهمی نانوذرات روی بهتر از منابع معدنی گزارش شد، هرچند هنوز هم نتایج متناقض است (Swain *et al.*, 2016).

با وجود مطالعات دامی مختلف، تأثیر مقایسه‌ای منابع و مکمل‌های مختلف روی بر متغیرهای مهم شکمبه (ازجمله جمعیت‌های میکروبی و آنزیم‌های هیدرولیتیک) به‌خوبی بررسی نشده است و اطلاعات چندانی در دسترس نیست. در این پژوهش فرض شد که افزودن مکمل روی به جیره پایه بتواند گروه‌های میکروبی و فعالیت آنزیمی شکمبه را بهبود دهد. هم‌چنین، فرض شد منابع آلی (به‌دلیل زیست‌فراهمی بهتر) و نانوذرات روی (به‌علت اندازه کوچک و سطح ویژه بیش‌تر)، در مقایسه با منابع معدنی، تأثیر بیش‌تری بر جمعیت‌های میکروبی و درنتیجه بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه و تخمیر خوراک داشته باشند. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر مکمل‌های مختلف عنصر روی (سولفات‌روی، اکسید روی، نانو اکسید روی و روی–متیونین) بر جمعیت‌های میکروبی، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک، آزادسازی متان، قدرت آنتی‌اکسیدانی و فرآورده‌های تخمیر شکمبه گوسفند در شرایط برون‌تنی بود. این پژوهش ضمن تکمیل یافته‌های قبلی، می‌تواند به شناسایی مناسب‌ترین منبع روی به‌منظور بهبود تخمیر شکمبه و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از هدررفت‌های تخمیری و نیز به شناخت بهتر مکانیسم‌های احتمالی دخیل در نحوه اثرگذاری منابع مختلف روی در دستگاه گوارش کمک کند.

۲. پیشینه پژوهش

طبق نتایج پژوهش‌های مختلف، افزودن مقادیر مناسب مکمل روی به جیره‌های پایه ضروری است و باعث بهبود عملکرد گونه‌های مختلف دامی می‌شود. هم‌چنین، آثار مثبت بر قابلیت هضم جیره و فعالیت آنزیمی در بدن دارد

(Suttle, 2022). کمبود روی مشکلات عملکرد و افت شاخص‌های سلامت و ایمنی حیوان را به‌دنبال دارد و در فرایند تخمیر و هضم خوراک نیز اثر منفی خواهد داشت (Eryavuz & Dehority, 2009). از سوی دیگر، مصرف سطوح بیش از حد عنصر مذکور پسندیده نیست زیرا ضمن آثار منفی اقتصادی، موجب برهم‌زدن تعادل عناصر معدنی مختلف، افت عملکرد و کاهش بازده خوراک می‌شود (Suttle, 2022).

منابع آلی عناصر از طریق پیوند یک ماده معدنی با یک جزء آلی (مانند پلی‌ساکارید یا اسیدآمینه) ساخته می‌شوند و به‌دلیل سازوکار جذب بهتر، داشتن تداخل کم‌تر با سایر مواد معدنی و نیز مشارکت بیش‌تر در فرایندهای سوخت‌وساز، موجب افزایش بازده اثربخشیِ عنصر معدنی می‌گردند (Suttle, 2022). منابع آلی روی به‌دلیل زیست‌فراهمی زیادتر می‌توانند تخمیر شکمبه (Alijani *et al.*, 2020)، عملکرد تولید و قدرت ایمنی دام را بهبود دهند (Suttle, 2022). این آثار درنهایت موجب کاهش آلودگی محیط زیست در مقایسه با نمک‌های معدنی نیز خواهد شد. با این‌حال، یافته‌ها در مورد اثر تغذیه منابع آلی عناصر بر عملکرد دام هنوز متناقض می‌باشد و در پژوهش‌های مختلف، عدم تأثیر یا اثر مثبت گزارش شده است. این نتایج متناقض به عواملی مانند نوع حیوان، مرحله فیزیولوژیک، سطح روی در جیره پایه، خلوص مکمل مصرفی، وجود یا عدم وجود عوامل تنش‌زا، ذخایر قبلی روی در بدن، محیط و فصل مربوط است (Alijani *et al.*, 2020; Alimohamady *et al.*, 2019). گروهی از پژوهش‌گران نشان دادند که مصرف مکمل روی- متیونین در گوسفند باعث بهبود هضم جیره در مقایسه با گروه مصرف‌کننده سولفات‌روی شد (Alimohamady *et al.*, 2019). در پژوهش دیگری، افزودن سطوح مختلف روی- متیونین در جیره گاو شیری، نوسان اندک در pH و کاهش غلظت آمونیاک شکمبه را در پی داشت (Shakweer *et al.*, 2006). حسینی وردنجانی (۱۳۹۶) با مصرف سطوح مختلف مکمل روی- متیونین به‌جای اکسید روی در جیره میش، تغییرات خاصی را در قابلیت هضم، pH، آمونیاک، اسیدهای چرب فرّار و پروتوزوآی شکمبه مشاهده نکرد.

راه‌کار مطرح‌شده دیگر برای بهبود زیست‌فراهمی روی، تولید نانوذرات با استفاده از روش‌های مطمئن، غیرمخرب و غیرسمی است. در این راستا، کاربرد نانوذرات روی (مانند nano-ZnO) در برخی زمینه‌ها مانند تغذیه حیوانات مطرح شده است (Swain *et al.*, 2016). به گفته برخی پژوهش‌گران، نانومواد معدنی به‌دلیل ویژگی‌های نوآورانه (یعنی اندازه نانو، نسبت سطح به حجم زیاد، فعالیت سطحی زیاد، بازده کاتالیزوری عالی و قابلیت جذب قوی) زیست‌فراهمی بسیار خوبی از خود نشان می‌دهند (Raje *et al.*, 2018; Swain *et al.*, 2016). پژوهش‌گران بیان کردند چنان‌چه نانوذرات اکسید روی با روش‌های اطمینان‌بخش، کم‌خطر و غیرسمی تولید شوند (مانند روش شیمی سبز، روش‌های زیستی و استفاده از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان؛ Swain *et al.*, 2016)، آثار تعدیل‌کننده بر سیستم ایمنی، بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، تحریک رشد حیوان و فعالیت علیه باکتری‌های مضر در حیوانات خواهند داشت (Mohamed *et al.*, 2017; Raje *et al.*, 2018). پژوهش‌گران دیگر نشان دادند که مصرف نانواکسید روی در مقایسه با اکسید روی موجب تقویت سیستم ایمنی و افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی در نشخوارکنندگان می‌شود و این بهبود را به زیست‌فراهمی بیش‌تر نانوذرات در سطح درون‌سلولی و کاهش مؤثرتر یون سوپراکسید نسبت دادند (Alijani *et al.*, 2020). نتایج آزمایش‌های دیگر نشان داد که کاربرد نانواکسید روی می‌تواند موجب بهبود تخمیر شکمبه و قابلیت هضم خوراک شود (Kumar, 2017; Mohamed *et al.*, 2017). علاوه بر این، به‌دلیل زیست‌فراهمی مناسب، استفاده از نانوذرات عناصر کمیاب می‌تواند دفع آن‌ها و آلودگی محیط را کاهش دهد (Raje *et al.*, 2018). البته نتایج متضاد (عدم تأثیر یا آثار منفی) نیز در مورد اثرگذاری نانوذرات روی گزارش شده است و لازم است پژوهش‌های بیش‌تری به‌منظور درک آثار احتمالی مثبت یا نامطلوب تغذیه نانوذرات در دام انجام شود (Swain *et al.*, 2016).

۳. روش‌شناسی پژوهش

مطالعه حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار، که عبارت بودند از ۱- جیره پایه فاقد مکمل روی (شاهد)، ۲- جیره حاوی مکمل سولفات روی، ۳- جیره حاوی مکمل اکسید روی، ۴- جیره حاوی مکمل نانواکسید روی و ۵- جیره حاوی مکمل آلی روی-متیونین، انجام شد. جیره پایه برای تأمین نیازهای غذایی گوسفند براساس جداول احتیاجات غذایی نشخوارکنندگان کوچک متوازن شد اما فاقد مکمل روی بود. سایر جیره‌ها حاوی ۳۰ میلی‌گرم روی اضافی در هر کیلوگرم ماده خشک از منابع مختلف (معدنی، نانو یا آلی) طبق تیمارهای بالا بودند. کمپلکس آلی از نوع روی-متیونین با خلوص ۹۹ درصد و حاوی ۱۲ درصد روی (شرکت Zinpro، ایالات متحده) و منبع نانو از نوع نانواکسید روی با خلوص بیش از ۹۹ درصد، حاوی ۷۹ درصد روی و اندازه ذرات ۱۰ تا ۳۰ نانومتر (شرکت US Research Nano-materials، ایالات متحده) بود. بدین ترتیب، غلظت روی در جیره پایه برابر ۲۷/۱ میلی‌گرم در کیلوگرم و در جیره‌های حاوی مکمل روی برابر ۵۷/۱ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک شد (جدول ۱). جیره پایه به شیوه‌ای متوازن گردید که حاوی مقادیر قابل‌توجهی از پروتئین، فیبر و کربوهیدرات‌های غیرفیبری باشد و احتمال تغییرات بالقوه در فعالیت‌های فیبرولیتیک، آمیلولیتیک و پروتئولیتیک شکمبه در اثر تیمارهای حاضر با محدودیت ناخواسته ناشی از کمبود منابع مغذی مواجه نشود.

جدول ۱. اجزای خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه

	غلظت		غلظت
اجزای خوراکی جیره (گرم در صد گرم ماده خشک)		**عناصر پرنیاز جیره** (گرم در صد گرم ماده خشک)	
یونجه خشک	۴۰	کلسیم	۰/۶۶
کاه گندم	۱۵	فسفر	۰/۲۶
دانه جو خردشده	۱۸	منیزیم	۰/۲۱
دانه ذرت خردشده	۲۰	**عناصر کم‌نیاز جیره** (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک)	
کنجاله سویا	۶	کبالت	۰/۲۳
پرمیکس ویتامینی- معدنی	۱	ید	۰/۸۹
ترکیب شیمیایی جیره (گرم در صد گرم ماده خشک)		آهن	۱۷۹
پروتئین خام	۱۲/۵	سلنیم	۰/۲۲
فیبر نامحلول در شوینده خنثی	۳۵/۶	منگنز	۲۱/۵
خاکستر	۶/۹۰	مس	۷/۸۳
عصاره اتری	۲/۴۹	روی[1]	۲۷/۱
انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)	۹/۹۹		

۱- غلظت روی در جیره‌های حاوی مکمل روی برابر با ۵۷/۱ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک بود، که از مجموع روی در جیره پایه (۲۷/۱ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) و روی (۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) حاصل از منابع سولفات، اکسید، نانواکسید و متیونین- روی فراهم شد.

به‌منظور بررسی تأثیر منابع عنصر روی بر جمعیت‌های میکروبی، آنزیم‌های هیدرولیتیک و فرآورده‌های تخمیر شکمبه‌ای، آزمون تولید گاز برون‌تنی در دو زمان انکوباسیون ۲۴ و ۷۲ ساعت انجام شد. سه تکرار به هر تیمار اختصاص یافت و آزمون در دو سری مختلف اجرا شد. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از هر جیره در داخل سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری جداگانه توزین گردید و سه سرنگ بدون نمونه (بلانک) در ابتدا، وسط و انتهای هر سری قرار داده شد. برای تهیه بزاق مصنوعی، آب مقطر و محلول‌های بافر، ماکرومینرال، میکرومینرال و رزازورین (به‌ترتیب با نسبت‌های ۴۰۰، ۲۰۰، ۲۰۰، ۰/۱ و یک میلی‌لیتر) در داخل ظرف مخلوط شدند و گرمادهی در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس، حجم ۴۰ میلی‌لیتر محلول احیاکننده اضافه گردید و جریان CO_2 به‌آرامی در محلول برقرار شد تا محلول شفاف (احیا) شود. شیرابه شکمبه با استفاده از لوله مری، از سه رأس گوسفند شال بالغ فیستوله‌دار، پیش از تغذیه صبح‌گاهی

جمع‌آوری شد و توسط چهار لایه پارچه متقال صاف گردید. پس از ریختن نمونه‌ها در داخل سرنگ، مقدار ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط شیرابه شکمبه–بزاق مصنوعی (با نسبت یک به دو) تزریق شد و حجم یادداشت شد. سرنگ‌ها در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ یا ۷۲ ساعت قرار داده شدند و در پایان، حجم کل گاز تولیدی ثبت شد. قابلیت هضم ماده آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز با استفاده از روابط (۱) و (۲) محاسبه گردیدند (Menke *et al.*, 1979).

$$OMD = ۱۴/۸۸ + ۰/۸۸۹۳ \times GP + ۰/۰۴۴۸ \times CP + ۰/۰۶۵۱ \times Ash$$ رابطه ۱)

$$ME = ۲/۲ + ۰/۱۳۵۷ \times GP + ۰/۰۰۵۷ \times CP + ۰/۰۰۰۰۲۸۵۹ \times EE^{۲}$$ رابطه ۲)

در رابطه‌های بالا، OMD، قابلیت هضم ماده آلی (گرم در کیلوگرم)؛ GP، حجم گاز تصحیح‌شده برای ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر به‌ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)؛ CP، پروتئین خام (گرم در کیلوگرم ماده خشک)؛ Ash، خاکستر (گرم در کیلوگرم ماده خشک)؛ ME، انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) و EE، عصاره اتری است. برای محاسبه سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی، محتویات هر سرنگ پس از ۲۴ یا ۷۲ ساعت انکوباسیون با استفاده از محلول شوینده خنثی به‌مدت یک ساعت جوشانده شد و صاف گردید. بقایای به جامانده بر روی کاغذ صافی خشک و سپس سوزانده شد. در پایان، سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی با کسرکردن بقایای پس از انکوباسیون از وزن نمونه اولیه محاسبه شد. تولید توده میکروبی (شاخص پروتئین میکروبی) با استفاده از رابطه (۳) برآورد شد (Makkar, 2010) که در آن، MBP، تولید توده میکروبی؛ TDS، سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی؛ GP، حجم گاز به‌ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک و ۲/۲ ضریب ثابت استوکیومتری است.

$$MBP = TDS - (۲/۲ \times GP)$$ رابطه ۳)

پس از نمونه‌گیری از شیرابه تخمیری داخل هر سرنگ، کشت و شمارش تعداد کل باکتری‌های سلولولیتیک با استفاده از لوله‌های هانگیت حاوی محیط کشت بی‌هوازی مایع و کاغذ صافی سلولزی واتمن به‌عنوان منبع غذایی باکتری‌های مذکور انجام شد و از انکوباتور (مدل Memmert، آلمان) برای تأمین دمای مناسب رشد میکروب‌ها استفاده گردید. برای تعیین تعداد کل باکتری‌های پروتئولیتیک از لوله‌های هانگیت حاوی محیط کشت مایع بی‌هوازی اختصاصی پروتئولیتیک‌ها و ژلاتین به‌عنوان منبع غذایی استفاده شد (Dehority, 2003). جداسازی و شمارش لوله‌های مثبت و منفی از روی عدم تجزیه یا تجزیه کاغذ صافی (سلولز) و ژلاتین در دو دسته لوله بالا مشخص گردید. برای تعیین جمعیت پروتوزوآیی، شیرابه تخمیری با نسبت مناسبِ محلول فرمال‌سالین مخلوط و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تعیین تعداد پروتوزوآها براساس روش Dehority (2003) و با استفاده از میکروسکوپ نوری (مدل Carl Zeiss, LABOVALT، آلمان) و لام هموسیتومتر (مدل Hawksley، انگلستان) انجام شد.

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک، محتویات تخمیری سرنگ گاز به ظرف ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد. پنج میلی‌لیتر محلول لیزوزیم و پنج میلی‌لیتر تتراکلرید کربن اضافه گردید و به‌مدت سه ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش با قراردادن ظرف بر روی یخ متوقف گردید. عمل سونیکاسیون (۵۰ میلی‌ولت) به‌مدت شش دقیقه انجام شد. نمونه در ۲۷،۰۰۰*g*، به‌مدت ۲۰ دقیقه (چهار درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ گردید و لایه رویی برای تعیین فعالیت آنزیمی جدا شد. سپس، فعالیت کربوکسی‌متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی، آلفاآمیلاز و پروتئاز با استفاده از روش‌های استاندارد (Makkar, 2010) تعیین گردید.

برای تخمین متان تولیدی در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت، حجم کل گاز ثبت گردید و سپس چهار میلی‌لیتر سود ۱۰ مولار (برای انجام واکنش و جذب CO_2 محیط تخمیر) به داخل سرنگ تزریق شد. پس از تکان‌دادن سرنگ، حجم گاز دوباره ثبت گردید که تقریباً معادل متان (و البته مقادیر جزئی هیدروژن) خواهد بود (Fievez *et al.*, 2005). ظرفیت کل

آنتی‌اکسیدانی مطابق با روش FRAP (توان شیرابه در احیای یون‌های فریک به فرو در حضور معرف تری‌پیریدیل تیرازین) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Genova، انگلستان) تعیین شد (Benzie and Strain, 1996).

میزان pH پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون با استفاده از pHمتر دیجیتال (مدل Sartorius PT-10، آلمان) اندازه‌گیری شد. برای تعیین آمونیاک، بخشی از شیرابه با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال (با نسبت پنج به یک) مخلوط و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. پس از یخ‌گشایی، غلظت نیتروژن آمونیاکی با استفاده از روش فنل-هیپوکلرایت و نورسنجی (میکروپلیت‌ریدر مدل Epoch، ایالات متحده) تعیین شد (Galyean, 2010). به‌منظور تعیین غلظت اسیدهای چرب فرّار، حجم پنج میلی‌لیتر شیرابه با ۰/۱ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۵۰ درصد مخلوط و منجمد گردید. غلظت اسیدهای استیک، پروپیونیک، ایزوبوتیریک، بوتیریک، ایزووالریک و والریک توسط دستگاه گازکروماتوگراف (مدل UNICAM 4600، انگلستان) تعیین شد (Galyean, 2010). دستگاه مجهز به آشکارساز فلیم یونیزاسیون[1] و ستون مویینه[2] (مدل Agilent 19095F-121، ایالات متحده) بود. از اسید ۲-اتیل بوتیریک به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده شد.

برای بررسی کینتیک تخمیر، آزمون گاز ۱۲۰ ساعته انجام شد و حجم گاز حاصل از تخمیر در زمان‌های دو، چهار، شش، هشت، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت ثبت گردید. فراسنجه‌های کینتیکی با استفاده از رابطه (۴) برآورد شد.

$$y = B\,(1 - e^{-ct})$$ رابطه ۴)

که در آن، y، حجم گاز در زمان t؛ B پتانسیل تولید گاز و c، ثابت نرخ تولید گاز است.

داده‌های حاصل با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) برای مدل (۵) تجزیه و میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطح آماری پنج درصد مقایسه شد. ارزش P بیش از پنج درصد و کم‌تر از ۱۰ درصد نیز متمایل به معنی‌داری در نظر گرفته شد.

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + R(T)_{ij} + e_{ijk} + e_{ijkl}$$ رابطه ۵)

در رابطه بالا، Y_{ijkl}، مقدار هر مشاهده؛ μ، میانگین؛ T_i، اثر ثابت تیمار؛ $R(T)_{ij}$، اثر تصادفی سری در تیمار؛ e_{ijk}، خطای آزمایشی و e_{ijkl}، خطای نمونه‌برداری است.

۴. یافته‌های پژوهش و بحث

همان‌طورکه ذکر شد، یکی از اهداف مهم پژوهش حاضر بررسی تغییرات احتمالی در جمعیت‌های میکروبی و آنزیم‌های هیدرولیتیک در اثر کاربرد منابع مختلف عنصر روی و تعیین مناسب‌ترین منبع بود. براساس داده‌های ارائه‌شده در جدول (۲)، پس از انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته، تعداد کل باکتری‌های سلولولیتیک در گروه‌های حاوی مکمل‌های مختلف روی در مقایسه با شاهد تغییری نیافت.

مطالعات در مورد مقایسه تأثیر منابع مختلف عنصر روی بر انواع باکتری‌های شکمبه اندک است. سرعت و میزان چسبیدن اولیه باکتری‌های سلولولیتیک به ذرات سلولز مرحله بحرانی ابتدایی در فرایند تخمیر سلولز بوده و بسیار مهم است. بنابراین هنگام کاربرد مکمل معدنی، کاتیون روی نباید اثر منفی بر تخمیر سلولز داشته باشد زیرا گزارش شده است که غلظت‌های زیاد روی ممکن است رشد باکتری‌های سلولولیتیک را کاهش دهد (Eryavuz & Dehority, 2009). براساس توضیح مذکور، عدم تغییر جمعیت سلولولیتیک‌ها در اثر مصرف منابع مختلف روی در پژوهش حاضر نشان

1. Flame ionization detector
2. Capillary column

می‌دهد که میزان رویِ اضافه‌شده به جیره‌ها بیش از حد نبوده است. از سوی دیگر، pH یکی از عوامل مؤثر بر جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک می‌باشد و افت شدیدِ آن موجب کاهش فعالیت و تعداد این گروه باکتریایی می‌شود (Dehority, 2003). در آزمایش حاضر، هرچند pH شکمبه‌ای با افزودن منابع مختلف روی نوساناتی داشت (در ادامه بحث خواهد شد)، اما در تمامی گروه‌های آزمایشی در دامنه مناسب برای باکتری‌های سلولولیتیک باقی ماند و لذا افت جمعیت این گروه میکروبی مشاهده نشد. هم‌چنین، پژوهش‌گران گزارش کردند که کمبود رویِ قابل‌دسترس برای باکتری‌ها ممکن است موجب کاهش اتصال آن‌ها به خوراک شود و از طرفی، افزایش بیش از حدِ روی، اثر بازدارندگی بر فعالیت باکتری‌های شکمبه دارد (Vázquez-Armijo *et al.*, 2011). نتایج آزمایش حاضر باز هم در این راستا بود که دُز مصرف و نوع منبع روی آثار منفی بر باکتری‌های فیبرولیتیک نداشتند.

جدول ۲. تأثیر افزودن منابع مختلف روی در جیره بر جمعیت کل باکتری‌های سلولولیتیک و پروتئولیتیک (لگاریتم ۱۰ در هر میلی‌لیتر شیرابه) و کل پروتوزوآی (ضرب‌در $۱۰^{۵}$ در هر میلی‌لیتر شیرابه) شکمبه گوسفند در شرایط برون‌تنی

جیره آزمایشی	باکتری‌های سلولولیتیک	باکتری‌های پروتئولیتیک	کل پروتوزوآ
۲۴ ساعت			
شاهد	۷/۱۵	۷/۴۵[a]	۸/۱۷
سولفات روی	۷/۲۳	۷/۲۴[bc]	۷/۸۲
اکسید روی	۷/۱۳	۷/۱۳[c]	۸/۰۱
نانواکسید روی	۷/۱۳	۷/۱۲[c]	۷/۷۸
متیونین روی	۷/۱۸	۷/۳۲[b]	۷/۵۵
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۰۶۷	۰/۰۲۴	۰/۱۷۴
P-value	۰/۸۱	۰/۰۰۵	۰/۰۸۷
۷۲ ساعت			
شاهد	۷/۰۸	۷/۴۰[a]	۷/۹۳
سولفات روی	۶/۹۷	۷/۱۸[b]	۷/۶۳
اکسید روی	۷/۱۸	۷/۱۷[b]	۷/۷۳
نانواکسید روی	۷/۰۲	۷/۱۳[b]	۷/۶۸
متیونین روی	۷/۲۰	۷/۲۵[ab]	۷/۷۲
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۰۵۴	۰/۰۵۷	۰/۲۲۵
P-value	۰/۱۲	۰/۰۴۵	۰/۵۱

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

پژوهش‌های چندانی در رابطه با تأثیر منابع مختلف عنصر روی بر فعالیت سلولولیتیکی شکمبه انجام نشده است. به‌هر حال، در یک مطالعه، افزودن مقادیر کم روی (پنج تا ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر شیرابه) تأثیر خاصی بر هضم سلولز نداشت، اما افزودن مقدار زیاد روی (۵۰ تا ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر شیرابه) هضم سلولز را کاهش داد که پژوهش‌گران آن را به کاهش فعالیت سلولولیتیکی میکروارگانیسم‌ها و کاهش چسبندگی باکتری‌ها به ذرات سلولز ربط دادند (Eryavuz & Dehority, 2009). آن‌ها گزارش نمودند که هرچند وجود غلظت مناسب عنصر روی به‌عنوان یک کاتیون برای فعالیت سلولولیتیکی و اتصال باکتری- فیبر مفید است، اما غلظت‌های زیاد از حدِ عنصر مذکور به‌سادگی جایگاه‌های اتصال موجود روی سطح سلول‌های باکتریایی را اشغال و محدود می‌کند و می‌تواند در فعالیت آنزیم‌هایی که در سطح میکروب یا بسیار نزدیک به آن قرار دارند، مداخله ایجاد نماید. علاوه بر این، وجود مقادیر فراوان روی در محیط تخمیر ممکن است پروتئین‌های محلول ازجمله آنزیم سلولاز موجود در شیرابه را غیرفعال کند زیرا نمک‌های فلزی می‌توانند پروتئین‌های محلول را رسوب دهند و دناتوره (واسرشت) نمایند (Eryavuz & Dehority, 2009). چنین آثار مضری در آزمایش حاضر مشاهده نشد.

در یک آزمایش برون‌تنی دیگر، با افزودن غلظت‌های مختلف روی (پنج، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم؛ به‌صورت نمک کلرید) به علف خشک، کاهش ضریب هضم ماده خشک مشاهده گردید و پیشنهاد شد که مکمل روی ممکن است در برخی شرایط فعالیت میکروب‌های تجزیه‌کننده فیبر را مهار کند (Arelovich *et al.*, 2000). اما در برخی پژوهش‌ها، نانوذره روی دارای آثار مثبت بر جمعیت میکروبی شکمبه بود. در یک آزمایش برون‌تنی، سطوح ۵۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم نانواکسید روی در هر کیلوگرم ماده خشک خوراک اضافه شد و نتایج نشان داد که مکمل مذکور سبب بهبود رشد میکروب‌های شکمبه و افزایش پروتئین میکروبی در فاز اولیه تخمیر (شش تا ۱۲ ساعت) شده است (Chen *et al.*, 2011). علت این نتایج متناقض به عواملی مانند نوع منبع روی، غلظت روی در جیره، ترکیب جیره پایه، روش تغذیه، خلوص منبع معدنی، حضور سایر مواد معدنی، نوع میکروارگانیسم‌های شکمبه و سایر عوامل مرتبط بوده است، زیرا این عوامل در میزان تأثیرگذاری روی بر میکروارگانیسم‌ها و تخمیر شکمبه نقش دارند (Alijani *et al.*, 2020; Arelovich *et al.*, 2000).

برخلاف سلولولیتیک‌ها، استفاده از منابع مختلف روی در جیره باعث کاهش جمعیت کل باکتری‌های پروتئولیتیک در انکوباسیون ۲۴ و ۷۲ ساعته شد ($P<0/05$) و این کاهش در تیمارهای سولفات، اکسید و نانواکسید روی ملموس‌تر بود، یعنی به‌نظر می‌رسد منابع با محلولیت بیش‌تر، در مقایسه با کمپلکس آلی روی- متیونین، تأثیر کاهشی شدیدتری بر باکتری‌های مذکور داشته‌اند. کاهش جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک در پژوهش حاضر با کاهش فعالیت پروتئاز و کاهش غلظت آمونیاک مطابقت داشت و نشان می‌دهد که درمجموع فعالیت پروتئولیتیک با مصرف مکمل‌های روی کاهش یافت و می‌تواند نشانه مثبتی در راستای کاهش اتلاف منابع ارزشمند پروتئینی به شکل آمونیاک باشد. این رخداد را شاید بتوان به تأثیر منفی انتخابی نمک‌های روی بر گروه‌های خاصی از باکتری‌های پروتئولیتیک مربوط دانست، زیرا منابع معدنی می‌توانند به‌صورت انتخابی بر برخی از گروه‌های خاص میکروبی عمل کنند (Karr *et al.*, 1991). با توجه به این‌که نوسان pH در پژوهش حاضر اندک بود، بنابراین به‌نظر می‌رسد تغییر در جمعیت پروتئولیتیکی به‌صورت مستقل از pH رخ داده باشد. احتمال تأثیر مکمل روی بر فعالیت پروتئولیتیکی شکمبه توسط پژوهش‌گران دیگر نیز گزارش شد (Arelovich *et al.*, 2000, 2014).

براساس اطلاعات جدول بالا، با گنجاندن مکمل روی در جیره، یک تمایل به کاهش در تعداد کل پروتوزوآها نسبت به تیمار شاهد در زمان ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون مشاهده شد. در مقایسه با نتیجه مطالعه حاضر، سایر پژوهش‌گران عدم تغییر جمعیت پروتوزوآیی شکمبه در اثر تغذیه مکمل‌های روی- متیونین و نانواکسید روی را گزارش نمودند (Alijani *et al.*, 2020). علاوه بر این در تحقیق زابلی و علی‌عربی (۱۳۹۲)، مکمل‌های اکسید روی و نانواکسید روی تأثیری بر تعداد کل پروتوزوآی شکمبه بزهای مرخز نداشتند. هم‌چنین، Kumar (2017) نشان داد که افزودن نانواکسید روی به جیره تأثیری بر تعداد پروتوزوآ در شرایط برون‌تنی ندارد.

تأثیر مکمل‌های مختلف روی مصرفی در مطالعه حاضر بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک در جدول (۳) ارائه شده است. افزودن مکمل‌های روی تأثیر معنی‌داری بر فعالیت کربوکسی‌متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز و تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی نداشت. عدم تغییر در فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک را می‌توان به‌سادگی با جمعیت مشابه باکتری‌های سلولولیتیک در گروه‌های مختلف (طبق جدول قبل) توجیه نمود. نتایج حاضر نشان داد که غلظت روی در جیره شاهد برای حفظ فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک کافی بوده است و درنتیجه افزایش غلظت روی جیره با استفاده از منابع مختلف، موجب بهبود بیش‌تری در فعالیت این آنزیم‌ها نشد. هم‌چنین، این میزان افزایش در محتوای روی جیره به حدی نبود که اثر منفی و مخرب (Eryavuz & Dehority, 2009) بر آنزیم‌های مذکور بگذارد، چنان‌که در بالا بحث شد.

جدول ۳. تأثیر افزودن منابع مختلف روی در جیره بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه‌ای گوسفند در شرایط برون‌تنی

جیره آزمایشی	کربوکسی متیل سلولاز[1]	میکروکریستالین سلولاز[1]	فعالیت تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی[1]	آلفاآمیلاز[1]	پروتئاز[2]
۲۴ ساعت					
شاهد	۴/۱۴	۲/۴۸	۳/۲۹	۹/۷۵[b]	۰/۴۷۲[a]
سولفات روی	۴/۳۵	۲/۶۱	۳/۶۰	۱۰/۵۲[a]	۰/۳۸۵[b]
اکسید روی	۳/۹۴	۲/۷۶	۳/۲۳	۱۰/۸۳[a]	۰/۳۸۲[b]
نانواکسید روی	۳/۸۲	۲/۲۴	۳/۳۳	۹/۸۹[b]	۰/۴۰۴[b]
متیونین روی	۴/۴۳	۳/۰۱	۳/۸۵	۱۰/۶۹[a]	۰/۴۰۷[b]
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۵۸۷	۰/۳۳۵	۰/۲۴۶	۰/۲۳۴	۰/۰۱۳
P-value	۰/۴۲	۰/۲۵	۰/۲۱	۰/۰۳۶	۰/۰۳۶
۷۲ ساعت					
شاهد	۳/۹۷	۲/۱۹	۳/۲۲	۸/۲۷[b]	۰/۴۸۸[a]
سولفات روی	۳/۸۶	۲/۰۲	۳/۰۵	۹/۰۲[a]	۰/۴۱۵[b]
اکسید روی	۴/۱۱	۲/۱۵	۳/۳۱	۸/۹۲[a]	۰/۳۹۱[b]
نانواکسید روی	۴/۰۸	۱/۹۵	۳/۰۲	۸/۰۶[b]	۰/۴۲۵[b]
متیونین روی	۴/۴۶	۲/۴۱	۳/۳۰	۸/۸۰[a]	۰/۴۳۳[b]
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۳۴۵	۰/۱۴۵	۰/۲۳۹	۰/۲۴۱	۰/۰۲۲
P-value	۰/۵۵	۰/۲۳	۰/۵۱	۰/۰۴۸	۰/۰۴۶

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

۱. براساس میکرومول گلوکز آزادشده در هر میلی‌لیتر در ساعت.

۲. براساس میلی‌گرم پروتئین آزادشده در هر میلی‌لیتر در ساعت.

برخلاف آنزیم‌های فیبرولیتیک، فعالیت آلفاآمیلاز در گروه‌های سولفات‌روی، اکسید روی و روی–متیونین نسبت به شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). به‌نظر می‌رسد افزودن روی به جیره به‌صورت انتخابی موجب بهبود شرایط فعالیت آمیلولیتیکی در محیط تخمیر (عکس پروتئولیتیک‌ها) شده است و این موضوع با افزایش تجزیه سوبسترا و قابلیت هضم ماده آلی و کاهش نسبت استات:پروپیونات هم‌خوانی دارد. افزایش فعالیت آلفاآمیلاز در پژوهش حاضر با افت نسبی در pH نیز مطابقت داشت زیرا کاهش pH در دامنه مناسب، موجب بهبود شرایط رشد و فعالیت باکتری‌های آمیلولیتیک می‌شود (Dehority, 2003). برخلاف سایر مکمل‌ها، کاربرد نانواکسید روی با بهبود فعالیت آلفاآمیلاز در زمان ۲۴ ساعت همراه نبود و حتی یک اثر کاهشی در ۷۲ ساعت داشت که شاید باعث این فرض شود که دز مصرف‌شده نانوذرات روی در این تحقیق، فعالیت باکتری‌های آمیلولیتیک را به‌صورت انتخابی کم کرده باشد. علت احتمالی آن است که نانوذرات دارای رفتار شیمیایی ویژه و فعالیت زیستی شدیدتری در سطح خود هستند (Swain *et al.*, 2016) و ممکن است مصرف زیاد آن‌ها در کنار فعالیت زیستی شدیدتر، اثر منفی بر فعالیت آمیلولیتیکی گذاشته باشد. به‌هر حال، اطلاعات علمی خاصی در این زمینه در دسترس نیست.

طبق جدول (۳)، فعالیت پروتئاز در ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون در اثر افزودن تمامی مکمل‌های روی در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵) و تأثیر مکمل روی–متیونین کم‌تر از دیگر منابع بود که طبق توضیح قبل، ممکن است به اختلاف در درجه حلالیت منبع مصرفی مرتبط باشد. بخشی از کاهش فعالیت پروتئاز در مطالعه حاضر به کاهش رخداده در جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک و درنتیجه کاهش ترشح آنزیم‌های مذکور مربوط است. از سوی دیگر، بخشی از این کاهش ممکن است به تأثیر کاهشی عنصر روی بر خودِ پروتئازها مرتبط باشد، زیرا بیان شده است که نمک‌های روی احتمالاً قادر باشند آنزیم‌های پروتئولیتیک برخی باکتری‌های شکمبه را به‌صورت انتخابی غیرفعال کنند و بنابراین تجزیه شکمبه‌ای پروتئین جیره را کاهش دهند (Karr *et al.*, 1991). تاکنون مطالعات خاصی درباره تأثیر نوع منبع روی (سولفات، اکسید، نانواکسید و روی–متیونین) بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک انجام نشده، اما کاهش فعالیت پروتئولیتیکی شکمبه با افزودن مکمل روی توسط پژوهش‌گران تأیید گردیده است (Arelovich *et al.*, 2000, 2014).

داده‌های قابلیت هضم و فراسنجه‌های تولید گاز برون‌تنی جیره‌ها در جدول (۴) نشان داده شده است. کاربرد روی از منابع سولفات‌روی، اکسید روی و روی–متیونین موجب افزایش میزان گاز تولیدی، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل سوخت‌وساز و پتانسیل تولید گاز نمونه‌ها در قیاس با تیمار شاهد شد (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین قابلیت هضم مربوط به گروه روی– متیونین بود.

جدول ٤. تأثیر افزودن منابع مختلف روی در جیره بر قابلیت هضم، انرژی قابل سوخت‌وساز و فراسنجه‌های تولید گاز برون‌تنی

جیره آزمایشی	GP_{24}[1]	OMD	ME	B	c
شاهد	۴۳/۸۳[b]	۶۳/۹۴[b]	۹/۳۱[b]	۶۳/۰۱[b]	۰/۰۶۴[ab]
سولفات روی	۴۶/۸۲[a]	۶۶/۶۱[a]	۹/۷۱[a]	۶۵/۰۲[a]	۰/۰۶۲[bc]
اکسید روی	۴۶/۹۰[a]	۶۶/۷۰[a]	۹/۷۲[a]	۶۵/۲۱[a]	۰/۰۷۱[a]
نانواکسید روی	۴۳/۶۵[b]	۶۳/۸۲[b]	۹/۲۸[b]	۶۲/۷۰[b]	۰/۰۵۰[c]
متیونین روی	۴۷/۵۴[a]	۶۷/۲۰[a]	۹/۸۱[a]	۶۵/۳۳[a]	۰/۰۶۷[ab]
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۸۴۵	۰/۷۵۲	۰/۱۱۴	۰/۸۷۷	۰/۰۰۴
P-value	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۷	۰/۰۱۳

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

۱. GP_{24}: گاز تولیدی ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)؛ OMD: قابلیت هضم ماده آلی (درصد)؛ ME: انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)؛ B: پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)؛ c: نرخ تولید گاز (در ساعت).

این افزایش ضریب هضمی و انرژی قابل سوخت‌وساز با افزودن مکمل‌های مذکور تا حدی به بهبود فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکننده کربوهیدرات‌ها (یعنی آلفاآمیلاز؛ طبق جدول ۳) در مقایسه با گروه شاهد مربوط است (Makkar, 2010). به‌علاوه، بخشی از افزایش مذکور را می‌توان به بهبود احتمالی در چسبیدن باکتری‌های سلولولیتیک به ذرات فیبر مربوط دانست، زیرا روی جزء کاتیون‌های دوظرفیتی مهم ایجادکننده اتصال بین باکتری (بار منفی) و ذره غذایی (بار منفی) است (Vázquez-Armijo *et al.*, 2011). یعنی هرچند تعداد باکتری‌های سلولولیتیک و فعالیت مجموعه آنزیم‌های فیبرولیتیک تغییری نکرد، اما میزان اتصال باکتری–خوراک بهبود یافت و احتمالاً منجر به تأثیر مؤثرتر آنزیم‌ها در تخمیر خوراک شده است. پس درمجموع، افزایش فعالیت آلفاآمیلاز و افزایش اتصال میکروب–خوراک به‌عنوان دو عامل بهبوددهنده هضم عمل کرده‌اند. به‌هر حال، برخلاف دیگر مکمل‌ها، افزودن نانواکسید روی به جیره تأثیری بر گاز تولیدی، قابلیت هضم و انرژی قابل سوخت‌وساز نداشت که علل احتمالی این رفتار نانوذرات در بالا بحث شد.

در قیاس با نتایج این مطالعه، سایر پژوهش‌گران تفاوتی را در تولید گاز در اثر مصرف سطوح مختلف عنصر روی گزارش نکردند (Chen *et al.*, 2019). از سوی دیگر، افزودن مکمل نانواکسید روی به جیره در برخی پژوهش‌ها تفاوتی را در فراسنجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم ایجاد نکرد (Ghaffri Chanzanagh *et al.*, 2018). این در شرایطی است که دیگران بهبود قابلیت هضم و متغیرهای تخمیر را در اثر مصرف نانواکسید روی در شرایط برون‌تنی (Kumar, 2017) و درون‌تنی (در گوسفند؛ Mohamed *et al.*, 2017) گزارش کردند. آن‌ها بهبود مشاهده‌شده را به فعالیت بیولوژیکی بیش‌تر نانوذرات و تحریک فعالیت میکروب‌های تجزیه‌کننده فیبر ربط دادند. این نتایج متناقض به عواملی مانند نوع منبع روی، غلظت روی در جیره، ترکیب جیره پایه، روش تغذیه، خلوص منبع معدنی، حضور سایر مواد معدنی، نوع میکروارگانیسم‌های شکمبه و سایر عوامل ربط داده شده است (Alijani *et al.*, 2020; Arelovich *et al.*, 2000).

همان‌طور که در جدول (۵) مشاهده می‌شود، تولید متان ۲۴ ساعته در گروه‌های مکمل روی نسبت به شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵). به‌هر حال با گذشت ۷۲ ساعت از انکوباسیون، تولید متان در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان می‌دهد تأثیر مکمل روی در کاهش آزادسازی متان در زمان‌های ابتدایی تخمیر اهمیت داشته، یعنی همان ساعت‌هایی که معمولاً شدت تخمیر بیش‌تر است.

جدول ۵. تأثیر افزودن منابع مختلف روی در جیره بر تولید متان، سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی، توده میکروبی و شاخص تفکیک‌پذیری در شرایط برون‌تنی

جیره آزمایشی	متان از کل گاز[1]	متان در واحد سوبسترا	TDS	MBP	EMBP	PF
۲۴ ساعت						
شاهد	۲۰/۱۲[a]	۴۴/۰۸[a]	۷۳۱[c]	۲۴۹	۰/۳۳۸	۳/۳۴
سولفات روی	۱۷/۴۸[bc]	۴۰/۷۶[ab]	۷۶۶[a]	۲۵۱	۰/۳۲۵	۳/۲۷
اکسید روی	۱۷/۸۲[ab]	۴۱/۷۲[a]	۷۶۱[a]	۲۴۵	۰/۳۲۲	۳/۲۵
نانواکسید روی	۱۸/۰۶[ab]	۳۹/۴۲[b]	۷۴۴[bc]	۲۶۴	۰/۳۵۲	۳/۴۱
متیونین روی	۱۵/۸۶[c]	۳۷/۷۴[b]	۷۵۸[ab]	۲۳۵	۰/۳۰۹	۳/۱۹
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۵۸۹	۱/۰۳	۷/۳۳	۱۳/۸۳	۰/۱۹۳	۰/۰۹۴
P-value	۰/۰۰۳	۰/۰۵۰	۰/۰۰۱	۰/۳۷	۰/۲۶	۰/۲۲
۷۲ ساعت						
شاهد	۱۴/۰۶	۴۴/۹۰	۸۲۲[b]	۱۴۹	۰/۱۸۳	۲/۶۹
سولفات روی	۱۴/۳۸	۴۶/۷۲	۸۳۳[ab]	۱۴۳	۰/۱۷۲	۲/۶۶
اکسید روی	۱۳/۷۴	۴۶/۰۹	۸۴۷[a]	۱۴۰	۰/۱۶۵	۲/۶۴
نانواکسید روی	۱۴/۲۹	۴۵/۴۳	۸۱۸[b]	۱۴۷	۰/۱۸۰	۲/۶۹
متیونین روی	۱۴/۲۸	۴۷/۵۸	۸۴۵[a]	۱۴۵	۰/۱۷۲	۲/۶۶
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۶۵۵	۲/۰۲	۶/۰۸	۱۷/۳۵	۰/۰۱۹	۰/۰۶۲
P-value	۰/۸۶	۰/۷۰	۰/۰۱۱	۰/۹۹	۰/۹۵	۰/۹۴

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

۱- متان از کل گاز (درصد از کل گاز تولیدی)؛ متان در واحد سوبسترا (میلی‌لیتر به‌ازای هر گرم سوبسترا)؛ TDS: سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)؛ MBP: تولید توده میکروبی (میلی‌گرم به‌ازای هر گرم ماده خشک)؛ EMBP: بازده تولید توده میکروبی (میلی‌گرم به‌ازای هر میلی‌گرم TDS)؛ PF: ضریب تفکیک‌پذیری (میلی‌گرم TDS بر میلی‌گرم گاز).

کاهش تولید متان در پژوهش حاضر با کاهش نسبیِ مشاهده‌شده در جمعیت پروتوزوآیی در زمان ۲۴ ساعت و نیز با افزایش غلظت پروپیونات هماهنگ است، زیرا پروتوزوآها دهنده هیدروژن به باکتری‌های متان‌زا هستند و کاهش آن‌ها معمولاً باعث افت تولید متان می‌شود (Dehority, 2003). از سوی دیگر، مسیر یون هیدروژن در تخمیر بسیار مهم است و هنگام ساخت استات و بوتیرات، هیدروژن بیش‌تری به سمت متان گسیل می‌شود، اما با افزایش تشکیل پروپیونات، یک مسیر رقابتی برای هیدروژن به‌وجود می‌آید که کاهش متان را به‌دنبال دارد (Makkar, 2010)؛ همان‌طوری‌که در پژوهش حاضر دیده شد.

میزان سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته در تیمارهای متیونین، اکسید و سولفات‌روی در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵) که با نتایج جدول (۴) هم‌راستا می‌باشد. این یافته نشان داد که گنجاندن مکمل‌های معدنی و آلی روی در جیره احتمالاً باعث بهبود تأمین روی موردنیاز و قابل‌دسترس برای فعالیت میکروبی و تخمیرشده و درنتیجه بهبود تجزیه میکروبی را در پی داشته است. درواقع، در پژوهشی مشخص شد که کمبود روی قابل‌دسترس برای باکتری‌های شکمبه موجب کاهش اتصال آن‌ها به ذرات خوراک و کاهش تکثیرشان می‌شود و نوع منبع روی نیز در این زمینه اهمیت زیادی دارد (Vázquez-Armijo *et al.*, 2011).

طبق نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر، توده میکروبی و ضریب تفکیک‌پذیری تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند و ضریب تفکیک‌پذیری در محدوده طبیعی (۲/۷ تا ۴/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر؛ Makkar, 2010) قرار داشت. عدم تفاوت به این علت بود که میزان سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی و تولید گاز هم‌راستا با یکدیگر تغییر یافتند. در این زمینه نیز نتایج مطالعات متناقض است. برای مثال، در یک آزمایش، تولید پروتئین میکروبی با مصرف مکمل روی بیش‌تر از گروه شاهد شد (Chen *et al.*, 2019) اما در مطالعه دیگری پروتئین میکروبی و ضریب تفکیک‌پذیری تحت تأثیر مکمل روی (اکسید و نانواکسید روی) قرار نگرفتند (زابلی و علی‌عربی، ۱۳۹۲). سایر پژوهش‌گران نیز عدم تغییر تولید پروتئین میکروبی را با مصرف مکمل‌های متیونین، اکسید و نانواکسید روی گزارش کردند (Alijani *et al.*, 2020).

تأثیر افزودن منابع مختلف روی در جیره بر pH، آمونیاک و قدرت آنتی‌اکسیدانی شکمبه‌ای گوسفند در شرایط برون‌تنی در جدول (۶) مشاهده می‌شود. براساس یافته‌های این پژوهش، میزان pH در تیمارهای اکسید، سولفات و متیونین‌روی در مقایسه با گروه شاهد کم‌تر بود (P<۰/۰۵).

جدول ٦. تأثیر افزودن منابع مختلف روی در جیره بر pH، آمونیاک و قدرت آنتی‌اکسیدانی شکمبه‌ای گوسفند در شرایط برون‌تنی

جیره آزمایشی	pH	نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (میکرومول آهن فرو در لیتر)
۲۴ ساعت			
شاهد	۶/۸۹[a]	۱۵/۸۱[a]	۶۹۱
سولفات روی	۶/۶۶[b]	۱۳/۲۸[b]	۷۲۵
اکسید روی	۶/۷۰[b]	۱۱/۴۱[c]	۷۲۶
نانواکسید روی	۶/۸۵[a]	۱۳/۹۳[ab]	۷۶۲
متیونین روی	۶/۵۷[b]	۱۳/۱۸[b]	۷۵۲
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۰۱۴	۰/۵۷۱	۳۵/۱۹
P-value	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۳۴
۷۲ ساعت			
شاهد	۶/۷۹[a]	۱۸/۹۳[a]	۷۴۲
سولفات روی	۶/۶۱[b]	۱۵/۶۵[b]	۷۴۵
اکسید روی	۶/۶۰[b]	۱۳/۰۹[c]	۷۶۹
نانواکسید روی	۶/۷۴[a]	۱۶/۹۶[ab]	۷۳۶
متیونین روی	۶/۵۳[b]	۱۵/۲۱[b]	۷۲۹
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۰۱۶	۱/۱۸	۳۹/۶۳
P-value	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۸۷

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

از عوامل تعیین‌کننده pH شکمبه می‌توان به تجمع فرآورده‌های تخمیری مانند آمونیاک و اسیدهای چرب فرّار اشاره کرد. در پژوهش حاضر، افزودن منابع معدنی و آلی روی موجب افزایش سوبسترای تجزیه‌شده و اسیدهای چرب فرّار و نیز کاهش تجمع آمونیاک شد. بنابراین افت pH منطقی به‌نظر می‌رسد و با میزان فعالیت آنزیمی در تیمارهای مذکور نیز مطابقت دارد. از سوی دیگر، عدم تأثیر نانواکسید روی بر pH شکمبه‌ای با عدم تغییر در میزان قابلیت هضم، غلظت اسیدهای چرب فرّار و آمونیاک در تیمار نانو هماهنگ بود.

غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزودن مکمل‌های روی در مقایسه با تیمار شاهد در هر دو زمان انکوباسیون کاهش یافت (P<۰/۰۵) و کم‌ترین آن در تیمار اکسید روی مشاهده شد. این کاهش به افت مشاهده‌شده در جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک، کاهش فعالیت پروتئاز و هم‌چنین تمایل به کاهش جمعیت پروتوزوآیی در تیمارهای مذکور مربوط است. درواقع، فعالیت پروتئولیتیکی در اثر افزودن منابع مختلف روی کاهش یافت. افزودن مکمل روی به جیره، با پیشگیری از تجزیه منابع پروتئین قادر است از تجمع آمونیاک در شکمبه جلوگیری کند. در یک پژوهش، افزودن سطوح مختلف روی- متیونین به جیره گاوها باعث کاهش غلظت آمونیاک شد (Shakweer *et al.*, 2006). در مطالعه برون‌تنی اجراشده توسط پژوهش‌گران دیگر (Chen *et al.*, 2011) نیز غلظت آمونیاک شکمبه با مصرف سطوح مختلف نانواکسید روی کاهش یافت. برخلاف نتایج تحقیق حاضر و دو مطالعه بالا، برخی پژوهش‌گران گزارش کردند که غلظت نیتروژن آمونیاکی با مصرف مکمل روی (اکسید روی و نانواکسید روی؛ ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) تغییر نمی‌کند (زابلی و علی‌عربی، ۱۳۹۲). عدم تأثیر تغذیه مکمل روی-گلیسین و روی-پروتئینات به‌جای سولفات‌روی بر آمونیاک شکمبه بره‌ها نیز گزارش شده است (Váradyová *et al.*, 2018).

یکی دیگر از صفات مهم در محیط‌های زیستی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است و کمبود روی می‌تواند موجب ضعف سیستم آنتی‌اکسیدانی شود (Alijani *et al.*, 2020). در پژوهش حاضر، استفاده از مکمل‌های مختلف روی موجب بروز یک روند افزایشی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با تیمار شاهد شد که البته معنی‌دار نبود. هرچند روی در سیستم ایمنی و دفاع آنتی‌اکسیدانی اهمیت زیادی دارد، اما به‌نظر می‌رسد غلظت روی در جیره شاهد پتانسیل ایجاد قدرت آنتی‌اکسیدانی کافی را در محیط تخمیر داشته و دز بالاتر روی موجب بهبود بیش‌تری در این متغیر نشده است. تأثیر مصرف انواع مکمل‌های روی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حیوان در پژوهش‌های مختلف متفاوت بوده است. حسینی وردنجانی (۱۳۹۶) گزارش کرد که مصرف سطوح مختلف شکل آلی و نانو روی، به‌جای منبع معدنی، تأثیری بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شکمبه میش ندارد. عدم اثر جایگزینی روی-پروتئینات و روی-گلیسین بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خون گوسفند توسط پژوهش‌گران دیگر نیز گزارش شد (Váradyová *et al.*, 2018). به‌هر حال در سایر مطالعات، استفاده از منابع آلی و نانواکسید روی (Alijani *et al.*, 2020; Mohamed *et al.*, 2017) به‌جای منابع معدنی موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گوسفند گردید. در مطالعه دیگری، مکمل‌های آلی و معدنی روی باعث بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی شکمبه شدند (Alimohamady *et al.*, 2019). برخی پژوهش‌گران نیز بیان نمودند که مکمل‌های نانو در کل دارای تأثیر مثبت بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی در حیوانات مختلف هستند (Raje *et al.*, 2018).

براساس داده‌های جدول (۷)، غلظت کل اسیدهای چرب فرّار در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته در تیمارهای اکسید روی، سولفات‌روی و روی-متیونین بیش‌تر از شاهد بود (P<۰/۰۵). این افزایش به بهبود سوبسترای تجزیه‌شده مربوط است و با تغییرات مثبت در فعالیت تخمیری (به‌ویژه فعالیت آمیلولیتیکی) نیز قابل توجیه است. به‌هر حال، مکمل نانواکسید روی تأثیری بر تولید اسیدهای چرب فرّار نداشت که با سایر صفات بحث‌شده مطابقت دارد. کاربرد مکمل‌های روی در پژوهش‌های مختلف آثار متفاوتی داشته است. در پژوهشی، افزودن نانواکسید روی به جیره موجب افزایش اسیدهای چرب فرّار در شرایط برون‌تنی شد (Kumar, 2017). به‌هر حال در آزمایش انجام‌شده توسط زابلی و علی‌عربی (۱۳۹۲)، اکسید و نانواکسید روی تأثیری بر کل اسیدهای چرب فرّار شکمبه‌ای در بزها نداشتند. در پژوهش دیگری، مصرف کلرید و سولفات‌روی در شرایط برون‌تنی فاقد اثر معنی‌دار بر اسیدهای چرب فرّار شکمبه بود (Arelovich *et al.*, 2014).

جدول ۷. تأثیر افزودن منابع مختلف روی در جیره بر غلظت کل (میلی‌مول در لیتر) و نسبت (درصد) اسیدهای چرب فرّار شکمبه گوسفند در شرایط برون‌تنی

جیره آزمایشی	غلظت کل	استات (A)	پروپیونات (P)	بوتیرات	ایزوبوتیرات	والرات	ایزووالرات	A:P
۲۴ ساعت								
شاهد	۵۰/۶۱[c]	۶۷/۳۵	۲۲/۸۵	۶/۶۴	۰/۵۴۴	۲/۵۲	۰/۰۹۶	۲/۹۵[b]
سولفات‌روی	۵۷/۸۵[a]	۶۴/۵۳	۲۵/۵۱	۶/۷۷	۰/۵۶۲	۲/۵۳	۰/۰۹۸	۲/۵۳[c]
اکسید روی	۵۵/۸۱[ab]	۶۲/۱۴	۲۸/۳۳	۶/۵۵	۰/۵۵۹	۲/۳۴	۰/۰۸۱	۲/۱۹[d]
نانواکسید روی	۵۱/۷۰[bc]	۶۸/۴۹	۲۱/۲۲	۶/۹۴	۰/۵۱۷	۲/۷۴	۰/۰۹۳	۳/۲۳[a]
متیونین‌روی	۵۸/۳۹[a]	۶۳/۹۴	۲۶/۵۶	۶/۴۳	۰/۵۸۴	۲/۴۰	۰/۰۸۶	۲/۴۱[c]
خطای استاندارد میانگین‌ها	۱/۳۳	۱/۴۶	۱/۲۸	۰/۵۰۷	۰/۰۴۳	۰/۲۳۹	۰/۰۰۸	۰/۱۰۹
P-value	۰/۰۰۴	۰/۰۸۵	۰/۰۶۶	۰/۹۶	۰/۸۴	۰/۷۸	۰/۶۹	۰/۰۱۲
۷۲ ساعت								
شاهد	۶۴/۰۸[b]	۶۶/۴۱	۲۴/۰۷	۶/۵۲	۰/۵۰۱	۲/۳۷	۰/۱۰۲	۲/۷۶[a]
سولفات‌روی	۶۵/۰۴[ab]	۶۳/۰۲	۲۷/۱۷	۶/۶۱	۰/۵۴۵	۲/۴۰	۰/۱۱۷	۲/۳۲[c]
اکسید روی	۶۵/۵۳[ab]	۶۴/۰۴	۲۵/۹۷	۶/۸۸	۰/۵۳۷	۲/۴۷	۰/۱۰۳	۲/۴۷[b]
نانواکسید روی	۶۳/۴۸[b]	۶۶/۰۱	۲۴/۵۵	۶/۵۰	۰/۵۱۷	۲/۳۰	۰/۱۲۳	۲/۶۹[a]
متیونین‌روی	۶۷/۹۶[a]	۶۳/۵۹	۲۷/۳۳	۶/۲۹	۰/۵۶۹	۲/۱۱	۰/۱۱۱	۲/۳۳[c]
خطای استاندارد میانگین‌ها	۱/۴۰	۱/۴۷	۰/۶۲۱	۰/۳۰۵	۰/۰۱۶	۰/۱۵۰	۰/۰۱۳	۰/۰۹۸
P-value	۰/۰۴۶	۰/۰۸۷	۰/۰۷۰	۰/۷۴	۰/۰۸۰	۰/۵۱	۰/۶۰	۰/۰۲۶

a-d: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

هم‌چنین، فقدان تأثیر مصرف مکمل روی–متیونین به‌جای اکسید روی بر غلظت کل اسیدهای چرب فرّار شکمبه میش‌های شیرده توسط حسینی وردنجانی (۱۳۹۶) نشان داده شد. در پژوهش دیگری نیز افزودن نانواکسید روی در جیره تفاوت معنی‌داری را در اسیدهای چرب فرّار ایجاد نکرد (Ghaffri Chanzanagh *et al.*, 2018).

در پژوهش حاضر استفاده از اکسید روی، سولفات‌روی و روی–متیونین موجب شد که یک روند کاهشی در درصد استات و یک روند افزایشی در درصد پروپیونات مشاهده شود و درنتیجه، نسبت استات:پروپیونات کاهش یافت (P<۰/۰۵). این نتایج با تغییرات رخ‌داده در فعالیت آمیلاز، جمعیت پروتوزوآیی و تولید متان مطابقت دارد. مطالعات دیگر نشان داد که غلظت‌های زیاد روی در جیره می‌تواند غلظت پروپیونات را افزایش و نسبت استات:پروپیونات را کاهش دهد (Arelovich *et al.*, 2000). در پژوهش دیگری نیز با بررسی سطوح افزایشی نانواکسید روی در جیره (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ یا ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) مشخص شد سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم موجب کاهش نسبت استات:پروپیونات در ساعات شش و ۱۲ انکوباسیون برون‌تنی می‌شود (Chen *et al.*, 2011).

۵. نتیجه‌گیری و پیشنهادها

براساس نتایج پژوهش حاضر، استفاده از مکمل‌های سولفات‌روی، اکسید روی و روی–متیونین (۳۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم ماده خشک) در جیره‌های پایه با هدف بهبود فعالیت آلفاآمیلاز شکمبه‌ای و قابلیت هضم جیره و کاهش فعالیت پروتئولیتیک، تجمع آمونیاک و تولید متان توصیه می‌شود، بدون آن‌که تأثیر منفی بر فعالیت فیبرولیتیک مشاهده شود، اما مصرف نانواکسید روی قابل‌توصیه نیست. درنهایت، پیشنهاد می‌شود آزمایش‌های بیش‌تری با هدف مشخص‌شدن تأثیر مکمل‌های مختلف عنصر روی بر جمعیت‌های میکروبی و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه در شرایط جیره‌ای متفاوت انجام شود.

۶. تشکر و قدردانی

از دانشگاه تربیت مدرس (تهران) به‌دلیل تأمین منابع مالی و امکانات برای انجام پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۷. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۸. منابع

حسینی وردنجانی، سیده فروغ. (۱۳۹۶). تأثیر تغذیه اکسید روی، متیونین روی و نانو اکسید روی، برابر یا بیش‌تر از توصیه NRC، در دوره پیش و پس از زایش بر عملکرد میش و بره. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

زابلی، خلیل و علی‌عربی، حسن (۱۳۹۲). اثر سطوح مختلف نانوذرات اکسید روی و اکسید روی بر برخی فراسنجه‌های شکمبه‌ای بزغاله‌های نر مرغوز به روش برون‌تنی و درون‌تنی. *تحقیقات تولیدات دامی*، ۲(۱)، ۱–۱۴.

References

Alijani, K., Rezaei, J., & Rouzbehan, Y. (2020). Effect of nano-ZnO, compared to ZnO and Zn-methionine, on performance, nutrient status, rumen fermentation, blood enzymes, ferric reducing antioxidant power and immunoglobulin G in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 267, 114532. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114532

Alimohamady, R., Aliarabi, H., Bruckmaier, R. M., & Christensen, R. G. (2019). Effect of different sources of supplemental zinc on performance, nutrient digestibility, and antioxidant enzyme activities in lambs. *Biological Trace Element Research*, 189, 75-84. doi:10.1007/s12011-018-1448-1

Arelovich, H. M., Amela, M. I., Martínez, M. F., Bravo, R. D., & Torrea, M. B. (2014). Influence of different sources of zinc and protein supplementation on digestion and rumen fermentation parameters in sheep consuming low-quality hay. *Small Ruminant Research*, 121(2-3), 175-182. doi:10.1016/j.smallrumres.2014.08.005

Arelovich, H. M., Owens, F. N., Horn, G. W., & Vizcarra, J. A. (2000). Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake, and digestion by cattle fed prairie hay and urea. *Journal of Animal Science*, 78(11), 2972-2979. doi:10.2527/2000.78112972x

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292

Chen, J., Wang, W., & Wang, Z. (2011). Effect of nano-zinc oxide supplementation on rumen fermentation *in vitro*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 23(8), 1415-1421.

Chen, M., Xi, Y., Zhang, L., Zeng, H., Li, Y., & Han, Z. (2019). Effects of zinc-bearing palygorskite on rumen fermentation *in vitro*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(1), 63-71. doi:10.5713%2Fajas.17.0920

Dehority, B. A. (2003). *Rumen Microbiology*, 1st ed. Nottingham (UK): Nottingham University Press, Thrumpton.

Eryavuz, A., & Dehority, B. A. (2009). Effects of supplemental zinc concentration on cellulose digestion and cellulolytic and total bacterial numbers *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 151(3-4), 175-183. doi:10.1016/j.anifeedsci.2009.01.008

Fievez, V., Babayemi, O. J., & Demeyer, D. (2005). Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 197-210. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.05.001

Galyean, M. L. (2010). *Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research*. Department of Animal and Food Sciences. Lubbock, TX, (USA): Texas Tech University.

Ghaffri Chanzanagh, E., Seifdavati, J., Gheshlagh, F. M. A., Benamar, H. A., & Sharifi, R. S. (2018). Effect of ZnO nanoparticles on *in vitro* gas production of some animal and plant protein sources. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(1), 25-32. doi:10.9775/kvfd.2017.18187

Hosseini Vardanjani, S. F. (2017). *Effect of pre- and post- partum feeding zinc oxide, zinc-methionine and nano-zinc oxide, equal or higher than NRC guideline, on ewe and lamb performance* (MSc Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran). (In Persian)

Karr, K. J., Dawson, K. A., & Mitchell Jr, G. E. (1991). Inhibitory effects of zinc on the growth and proteolytic activity of selected strains of ruminal bacteria. *Beef Cattle Res. Rep.*, 337, 27 p.

Kumar, S. S. R. (2017). *Green synthesis of nanoparticles using plant extracts and their effect on rumen fermentation in vitro* (MSc Thesis, P. V. Narasimha Rao Telangana Veterinary University, Rajendranagar, Hyderabad, India).

Makkar, H. P. S. (2010). *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: P. E. Vercoe, H. P. S. Makkar, & A. C. Schlink (Eds.), *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies* (pp. 107-144). Dordrecht (the Netherlands): IAEA.

Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 217-222. doi:10.1017/S0021859600086305

Mohamed, M. Y., Ibrahim, K., Abd El Ghany, F. T. F., & Mahgoup, A. A. S. (2017). Impact of nano-zinc oxide supplementation on productive performance and some biochemical parameters of ewes and offspring. *Egyptian Journal of Sheep and Goats Sciences*, 12(3), 49-64. doi:10.21608/ejsgs.2017.26308

Raje, K., Ojha, S., Mishra, A., Munde, V. K., Rawat, C., & Chaudhary, S. K. (2018). Impact of supplementation of mineral nano particles on growth performance and health status of animals: a review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 1690-1694.

Shakweer, I. M. E., El-Nahas, H. M., & El-Mekass, A. A. M. (2006). Effect of supplemental zinc methionine concentrations on digestibility, feed efficiency and some ruminal and blood parameters and performance of Friesian calves. *Journal of Agricultural Science (Mansoura University)*, 31(8), 5015-5023.

Suttle, N. F. (2022). *Mineral Nutrition of Livestock*, 5th ed., Cambridge (USA): CABI.

Swain, P. S., Rao, S. B. N., Rajendran, D., Dominic, G., & Selvaraju, S. (2016). Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. *Animal Nutrition*, 2(3), 134-141. doi:10.1016/j.aninu.2016.06.003

Váradyová, Z., Mravčáková, D., Holodová, M., Grešáková, Ľ., Pisarčíková, J., Barszcz, M., ... & Čobanová, K. (2018). Modulation of ruminal and intestinal fermentation by medicinal plants and zinc from different sources. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(5), 1131-1145. doi:10.1111/jpn.12940

Vázquez-Armijo, J. F., Martínez-Tinajero, J. J., López, D., Salem, A. F. Z. M. S., & Rojo, R. (2011). *In vitro* gas production and dry matter degradability of diets consumed by goats with or without copper and zinc supplementation. *Biological Trace Element Research*, 144, 580-587. doi:10.1007/s12011-011-9113-y

Zaboli, K., & Aliarabi, H. (2013). Effect of different levels of zinc oxide nano particles and zinc oxide on some ruminal parameters by *in vitro* and *in vivo* methods. *Animal Production Research*, 2(1), 1-14. (In Persian)