نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۵، تابستان ۱۳۹۶
ص‌ص: ۱۷~۳۶

تأثیر مکمل‌های آلی روی و سلنیوم بر مصرف خوراک، قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در گوسفند

- **احد قربانی**
دانش آموخته کارشناسی ارشد ، گروه علوم دامی؛ دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
- **محمد ابراهیم نوریان سرور** (نویسنده مسئول)
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
- **محمد مهدی معینی**
دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش : آذر ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۳۳۶۷۶۰۶
Email: menooriyan@razi.ac.ir

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تأثیر مکمل روی-متیونین و سلنومتیونین بر مصرف خوراک، قابلیت هضم، فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای و جمعیت پروتوزوآیی، در دو بخش بر روی گوسفندان انجام شد. در آزمایش اول(درون تنی)، بیست رأس قوچ سنجابی (۵۰±۵/۶ کیلوگرم) به طور تصادفی به چهار تیمار شامل: ۱) جیره آزمایشی شاهد و بدون افزودن روی و سلنیوم؛۲) جیره پایه به علاوه ۳۰۰ میلی‌گرم سلنومتیونین در کیلوگرم ماده خشک؛ ۳) جیره پایه به علاوه ۴۰۰ میلی‌گرم روی-متیونین در کیلوگرم ماده خشک و ٤) جیره پایه به علاوه۴۰۰ میلی‌گرم روی-متیونین و ۳۰۰ میلی‌گرم سلنومتیونین تقسیم شدند. در آزمایش دوم، از گوسفندان گروه شاهد مایع شکمبه گرفته شد و بر اساس آزمون تولید گاز به روش برون‌تنی فراسنجه‌های تخمیر مطالعه شد وآزمون گاز در چهار گروه: ۱) شاهد (مایع شکمبه بدون روی و سلنیوم)،۲) افزودن ۳۰۰ میلی‌گرم سلنومتیونین به مایع شکمبه، ۳) افزودن ۴۰۰ میلی‌گرم روی-متیونین و ٤)افزودن همزمان ٤۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم روی- سلنیوم به ازاء هر ۳۰ میلی‌لیترمایع شکمبه انجام شد. در آزمایش اول، افزودن مکمل روی-متیونین و سلنومتیونین به جیره باعث کاهش انرژی قابل سوخت و ساز، قابلیت هضم ماده آلی، نیتروژن آمونیاکی و کل اسیدهای چرب زنجیر کوتاه (p= ۰/۰۰۱) شد، ولی ضریب تفکیک پذیری و پروتئین میکروبی در سه تیمار نسبت به شاهد بهبود یافت (p= ۰/۰۰۱). مکمل‌های روی و سلنیوم تأثیری بر خوراک مصرفی، انرژی قابل سوخت و ساز مصرفی و گاز متان نداشت. مصرف مکمل‌های آلی روی و سلنیوم جمعیت کل پروتوزوآیی را از طریق تغییر در جمعیت انتودینینه‌ها افزایش دادند (p=۰/۰۰۱).
نتایج آزمایش دوم (برون‌تنی) نشان داد، افزودن روی و سلنیوم به محیط تخمیر در مقایسه با گروه شاهد غلظت نیتروژن آمونیاکی را کاهش (p=۰/۰۰۱) و pH را افزایش (p=۰/۰٤۸) داد. جمعیت کل و زیر خانواده‌های پروتوزوآ در دو تیمار روی-متیونین و سلنومتیونین نسبت به شاهد کاهش و جمعیت کل پروتوزوآ در تیمار دریافت کننده روی-سلنیوم افزایش یافت (p =۰/۰۰۱). مقادیر فراسنجه‌های تخمیر بین دو آزمایش اول (دام زنده) و دوم (برون‌تنی یاآزمایشگاهی) تفاوت داشت و تنها غلظت اسیدهای چرب فرار و انرژی قابل سوخت و ساز در دو روش مشابه بود. در مجموع، استفاده از مکمل روی-متیونین و سلنومتیونین تأثیر مطلوبی بر تخمیر شکمبه گوسفندان نداشت، اما سبب افزایش جمعیت پروتوزآیی شد. همچنین، در این مطالعه روش آزمایشگاهی معیار مناسبی برای ارزیابی تأثیر مکمل معدنی بر تخمیر شکمبه به روش درون تنی نبود.

واژه‌های کلیدی: روی-متیونین، سلنیومتیونین، مصرف خوراک، قابلیت هضم، مایع شکمبه، گوسفند

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 17-36

The effect of organic zinc and selenium supplementations on feed intake, digestibility and rumen fermentation parameters in sheep

By: 1: Mohammad Ebrahim Nooriyan Soroor, Assistant Professor, Animal Science Department, Agriculture Faculty , Razi University, Kermanshah, Iran , Email: menooriyan@razi.ac.ir
Tel: 0098-9183367606
2: Ahad Ghorbani, MSc Student, Animal Science Department, Agriculture Faculty, Razi University, Kermanshah, Iran.
3: Mohammad Mahdi Moeini. Associate Professor, Animal Science Department, Agriculture Faculty, Razi University, Kermanshah, Iran.

Received: January 2016 **Accepted: December 2016**

This study was conducted to evaluate the effect of dietary inclusion of zinc-methionine (Zn-Met) and seleno-methionine (Se-Met) on feed intake, digestibility, rumen fermentation and protozoa population in sheep at two phases. In Exp.1, 20 Sanjabi rams (50±5.6 kg) were assigned to one of the four treatments as: 1) basal diet or control without Zn-met or Se-met supplements (Con); 2) basal diet supplemented with 300 mg Se kg^{-1} of DM; 3) basal diet supplemented with 400 mg Zn kg^{-1} of DM; 4) basal diet supplemented with 300 mg Se plus 400 mg Zn Kg^{-1} of DM (Zn-Se). In Exp.2, the fermentation parameters were studied by an *in vitro* gas test using the rumen fluid from control rams. The gas test was conducted for the treatments as: 1) basal diet or control; 2) basal diet supplemented with 300 mg Se-Met/30 ml rumen fluid(RF); 3) basal diet supplemented with400 mg Zn-Met/30 ml RF; 4) basal diet supplemented with 300 mg Se-Met plus 400 mg of Zn-Met /30 ml RF (Zn-Se). In Exp.1, metabolisable energy, organic matter digestibility, ammonia nitrogen and total short chain fatty acids were decreased by Zn-Met and Se–Met supplementation (p=0.001), however, the partitioning factor and microbial protein were improved (p=0.001) in treatments containing mineral supplements(p=0.001). The Zn-Met and Se-Met had no effects on dry matter intake, metabolisable energy, intake and methane gas. The Zn and Se supplements were increased total protozoa population via*intodinnine* change. In Exp. 2(*in vitro*), the addition of Zn and Se to the fermentation medium resulted in decreasing ammonia nitrogen (p=0.001) and increasing pH (p=0.048). Total protozoa population and all sub families of protozoa were declined by the Zn and Se treatments (p=0.001), and increased by the Zn-Se treatment. The fermentation parameters were different between Exp.1 (*in vivo*) and Exp. 2(*in vitro*), and only VFA and metabolisable energy were similar in two experiments. In conclusion, the addition of Zn-Met and Se-Met had no useful effect on the rumen fermentation parameters of sheep , however, the protozoa population was increased. Also in this study, *in vitro* method was not a suitable index for evaluating the effect of mineral supplements on the *in vivo* rumen fermentation.

Key words: Zinc- Methionine, Seleno-Methionine, Feed Intake, Digestibility, Rumen Fluid, Sheep

مقدمه

به منظور بهینه نمودن تولید و سلامت دام، وجود مقادیر کافی مواد معدنی در جیره ضروری است (NRC، ۲۰۰۷). روی دارای نقش بنیادی در بیان ژن و تمایز و تکامل سلولی است که در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی نیز حضور دارد. همچنین، روی به منظور انجام مطلوب واکنش‌های متابولیکی، یک عنصر ضروری مورد نیاز نشخوارکننده و میکروارگانیسم‌های شکمبه است (Eryavuz و Dehority، ۲۰۰۹). کمبود روی می‌تواند سبب اختلال در رشد (Jia وهمکاران ، ۲۰۰۹)، کاهش مصرف خوراک، افزایش احتمال مسمومیت آمونیاکی، تغییر نسبت پروپیونات به استات و بازده مصرف انرژی گردد (Arelovich و همکاران، ۲۰۰۰). از سوی دیگر، هدر روی منابع نیتروژن از طریق تولید نیتروژن آمونیاکی و انرژی از مسیر تولید متان در گوسفندان سبب کاهش

عملکرد دام می‌گردد (Arelovich و همکاران، ۲۰۰۰).

غلظت سلنیوم در منابع گیاهی مورد استفاده در جیره نشخوارکنندگان به شدت متغیر است. بنابراین، غلظت سلنیوم جیره ممکن است ناکافی باشد و از آنجایی که جذب سلنیوم در نشخوارکنندگان (۳۴ درصد) کمتر از حیوانات تک‌معده‌ای (۸۵ درصد) است (Wright و Bell ، ۱۹۹۶) و این عنصر نقش تأثیرگذاری در ۲۰ سلنوپروتئین دارد (Wang و همکاران، ۲۰۰۹)، کمبود آن می‌تواند سبب تغییردر تخمیر شکمبه و عملکرد دام گردد. افزودن سلنیوم به جیره می‌تواند سبب بهبود افزایش وزن روزانه دام گردد (Shi و همکاران، ۲۰۱۱).با توجه به جذب پایین سلنیوم و عدم ذخیره روی در بدن گوسفند؛ در تحقیقات دامی مقادیر دو عنصر مذکور را بیش از حد نیاز در نظر می‌گیرند تا آثار مثبت احتمالی آنها را شناسایی کنند. همچنین، در تغذیه عملی گوسفندان مقادیر بیش از توصیه انجمن ملی تحقیقات را در نظر می‌گیرند تا تاثیر تنش‌های محیطی و آنتاگونیست با سایر عناصر بر جذب روی را خنثی کنند (Sobhanirad و Naserian، ۲۰۱۲). به توصیه انجمن ملی تحقیقات گوسفند (۲۰۰۷)، تغذیه روزانه ۴۹ میلی‌گرم روی و ۰/۴۶ میلی‌گرم سلنیوم خالص در گوسفندان ۵۰ کیلوگرمی ضروری است. مطالعات نشان داده است تامین روی در دام سبب بهبود تخمیر شکمبه و افزایش اسیدهای چرب فرار (Spears و همکاران، ۲۰۰۴) و بهبود افزایش وزن روزانه بز (Jia و همکاران، ۲۰۰۹) می‌گردد. همچنین، استفاده از مکمل روی- متیونین در جیره نسبت به گروه شاهد سبب بهبود افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک در بره‌ها شده است (Garg و Vishal Mudgal، ۲۰۰۸). استفاده از مکمل روی- متیونین در جیره گوساله‌های پرواری با تامین ۲۰ میلی‌گرم روی در هر کیلوگرم ماده خشک سبب کاهش غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه در مقایسه با جیره شاهد و منابع سولفات روی شده است (Spears و همکاران، ۲۰۰۴)؛ گرچه هیچ گونه تاثیری بر ماده خشک مصرفی و ابقاء روی در بدن نداشته است. استفاده ۹ برابر حد نیاز روی- متیونین (۵۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم) در جیره گاوهای شیری هیچ گونه تاثیر منفی بر فراسنجه‌های خونی دام نداشته است (Sobhanirad و Naserian، ۲۰۱۲). استفاده از ۲۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم روی- متیونین در جیره پایه حاوی ۲۲/۳ میلی‌گرم روی، ضمن عدم تاثیر بر ماده خشک مصرفی بزها، سبب بهبود افزایش وزن روزانه آنها شده است (Jia و همکاران، ۲۰۰۹).افزودن روی در جیره گاو، تجزیه شکمبه‌ای پروتئین را کاهش داده (Arelovich و همکاران، ۲۰۰۰)، و فعالیت اوره‌آز را در روش آزمایشگاهی مهار کرده است و لذا امکان دخالت عنصر روی در فرایند تجزیه پروتئین شکمبه‌ای وجود دارد (Bateman و همکاران، ۲۰۰۴). استفاده از ۴۰ میلی‌گرم روی- متیونین یا سولفات روی در دو روش برون‌تنی و درون‌تنی در گوسفندان سنجابی جمعیت پروتوزوآیی شکمبه را کاهش داده است (کاظمی، ۱۳۹۴). افزودن روی به مقدار ۱۱۴۲ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک مصرفی گاوهای پرواری؛ غلظت اسیدهای چرب فرار، آمونیاک و هضم شکمبه‌ای اسیدهای آمینه را به ترتیب ۲۰/۷، ۲۲/۷ و ۶۱/۶ درصد افزایش داده، و پروتوزوآ را سه برابر بیشتر کرده است (Froetschel و همکاران، ۱۹۹۰). استفاده از سه سطح روی (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به روش برون‌تنی در ساعات ۲۴ و ۴۸ انکوباسیون (Eryavuz وDehority، ۲۰۰۹) و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر(Bonhomme و همکاران، ۱۹۷۹) در گوسفند، فعالیت باکتری‌های سلولولایتیک را مهار و هضم سلولز را کاهش داده است. نتایج متناقض گزارش شده در خصوص تاثیر عناصر روی و سلنیوم بر دام و همچنین تحقیقات کم در خصوص تأثیر این دو عنصر بر فرایند تخمیر شکمبه و جمعیت پروتوزوایی گوسفندان از دلایل انجام این تحقیق بود. در حال حاضر نیز مطالعات اندکی در خصوص مصرف روی و سلنیوم در گوسفندان ایرانی به مقدار بیش از نیاز دام انجام شده است. لذا این تحقیق با هدف مطالعه تاثیر تغذیه مکمل‌های روی (روی- متیونین) (۱/۹۵ برابر توصیه NRC) و سلنیوم (سلنومتیونین) (۱/۴ برابر توصیه NRC) بر مصرف خوراک، قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیرشکمبه در گوسفند با دو روش درون‌تنی و برون‌تنی و اعتبار سنجی روش آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول: دام، تیمارهای آزمایشی و مصرف خوراک

تعداد ۲۰ راس قوچ نژاد سنجابی با میانگین وزن زنده ۵/۶±۵۰ کیلوگرم از سن حدود ۱۴ ماهگی در یک دوره آزمایش ۴۵ روزه برای دو مرحله به روش آزمایشگاهی و دام زنده در قفس‌های انفرادی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی نگهداری شدند. گوسفندان در چهار تیمار ۱) شاهد (جیره پایه بدون مکمل روی و سلنیوم)، ۲) دریافت کننده مکمل سلنومتیونین (جیره حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم سلنومتیونین درکیلوگرم ماده‌ی خشک)، ۳) دریافت کننده مکمل روی-متیونین (جیره حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم روی-متیونین در کیلوگرم ماده‌ی خشک) و ۴) دریافت کننده هر دو مکمل روی-سلنیوم (جیره حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم سلنومتیونین و ۴۰۰ میلی‌گرم روی- متیونین در کیلوگرم ماده‌ی خشک) و هر تیمار در ۵ تکرار دسته بندی شدند. مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم روی-متیونین با غلظت ۱۰ درصد روی (شرکت سنا دام پارس) حاوی ۴۰ میلی‌گرم روی و ۳۰۰ میلی‌گرم سلنومتیونین (شرکت سنا دام پارس) با غلظت ۰/۰۰۱ حاوی ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم خالص بودند. نیاز گوسفندان شاهد به مواد مغذی (جدول ۱) بر اساس توصیه NRC(۲۰۰۷) برآورد گردید و آب تازه به صورت مداوم در اختیارآن‌ها قرار داشت. خوراک روزانه‌ی گوسفندان در دو وعده (ساعات ۸/۰۰ و ۱۶/۰۰) توزیع و صبح روز بعد، باقیمانده خوراک روز قبل جمع‌آوری گردید. مکمل‌های روی و سلنیوم در وعده صبح قبل از توزیع غذا با مقداری سبوس مخلوط و در اختیار گوسفندان قرار گرفت تا از مصرف آن اطمینان حال گردد. در مدت ۱۲ روز عادت‌پذیری گوسفندان، واکسن آنتروتوکسمی تزریق، و داروهای ضد انگل خورانده شد. به توصیه انجمن ملی تحقیقات گوسفند (۲۰۰۷) تغذیه روزانه ۴۹ میلی‌گرم روی و ۰/۴۶ میلی‌گرم سلنیوم خالص در گوسفندان ۵۰ کیلوگرمی ضروری است. مقدارماده خشک جیره،خاکستر، پروتئین خام، عصاره اتری، و NDF بر اساس روش‌های استاندارد تعیین گردید (AOAC،۱۹۹۰).

جدول۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره‌ی آزمایشی (درصد ماده خشک یا واحد بیان شده) بدون افزودن مکمل‌های روی و سلنیوم.

اجزای جیره	
یونجه خشک	۸۰
دانه ذرت	۸
دانه جو	۱۰
کنجاله سویا	۲
ترکیب شیمیایی جیره	
ماده خشک (درصد وزن تازه)	۹۰/۷۸
انرژی قابل سوخت و ساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)	۱۰/۳۳
پروتئین خام	۱۳/۰۵
عصاره اتری	۲/۷۵
خاکستر	۹/۳۱
الیاف نامحلول در شوینده‌ی خنثی	۳۲/۸۴
الیاف نامحلول در شوینده‌ی اسیدی	۲۴/۲۶
روی (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۲۳/۷۰
سلنیوم (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۰/۱۱۳
متیونین (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۲/۷۲

جدول ۲ : غلظت روی و سلنیوم جیره و نیاز گوسفند ۵۰ کیلوگرمی به روی و سلنیوم.

روی جیره پایه	میلی‌گرم / کیلوگرم ماده خشک	۲۳/۷۰
سلنیوم جیره پایه	میلی‌گرم / کیلوگرم ماده خشک	۰/۱۱۳
روی آلی افزوده شده	میلی‌گرم / کیلوگرم ماده خشک	۴۰
سلنیوم آلی افزوده شده	میلی‌گرم / کیلوگرم ماده خشک	۰/۳
روی کل مصرفی	میلی‌گرم در روز	۹۵/۵۵
سلنیوم کل مصرفی	میلی‌گرم در روز	۰/۶۴۸
نیاز روزانه گوسفند	میلی‌گرم	
روی		۴۹
سلنیوم		۰/۴۶

برآورد معادلاتی گاز متان

برآورد گاز متان تولیدی (مگاژول در روز) (هدر روی انرژی خام ناشی از تولید متان) با استفاده از رابطه‌های ۱ و ۲ محاسبه گردید (Ellis و همکاران، ۲۰۰۷).

$$CH4_{(MJ/d)} = ۳/۹۶(\pm ۱/۱۸) + ۰/۵۶۱(\pm ۰/۱۳۰) \times DMI_{(kg/d)}$$

رابطه۱)

$$CH4_{(MJ/d)} = ۲/۷۰(\pm ۱/۳۸) + ۱/۱۶(\pm ۰/۲۷۱) \times DMI\ (kg/d) - ۱۵/۸(\pm ۶/۸۶) \times EE\ (kg/d)$$

رابطه۲)

که در آنها DMI ماده خشک مصرفی و EE عصاره اتری می‌باشد.

آزمون تولید گاز

پس از چهل روز از شروع آزمایش و مصرف گوسفندان از یکی از چهار جیره ذکره شده، مایع شکمبه در حالت ناشتا با استفاده از لوله‌ی مری از همه گوسفندان چهار تیمار دریافت، و توسط چهار فلاسک جداگانه برای چهار تیمار به آزمایشگاه منتقل شد. مایع شکمبه با نسبت یک به دو؛ با بافر بی‌کربنات مخلوط و سپس میزان ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه‌ی بافری به هر یک از بطری‌های ویتن حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم جیره‌ی پایه (خوراک جدول ۱) اضافه شد (Menke و Steingass ، ۱۹۸۸). از هر فلاسک تعداد ۱۰ تکرار (۱۰ بطری ۱۲۰ میلی لیتری) تهیه گردید. این آزمایش در دو سری و برای هر سری تعداد ۴۵ بطری ۱۲۰ میلی لیتری آماده (۴۰ تیمارها ، ۵ بلانک) شد. یک سری از بطری‌ها برای آزمون ۹۶ ساعت و سری دیگری برای آزمون ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد.

محیط‌های تخمیر یا همان بطری‌های ویتن[1] ۱۲۰ میلی‌لیتری و محتویات داخل آن در دمای ۳۹ درجه سلسیوس و به مدت ۹۶ و ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

این بخش از آزمایش با هدف اندازه گیری فراسنجه‌های کینتیک تخمیر، انرژی قابل سوخت و ساز و ماده آلی قابل هضم انجام شد. کینتیک تخمیر گاز، از طریق ثبت گازهای ساعات صفر، ۳، ۶ ، ۹ ، ۱۲ ، ۲۴ ، ۴۸ ، ۷۲ و ۹۶ و رابطه ۳ (Ørskov و McDonald، ۱۹۷۹) و نرم افزار Fit cruve 6.0 برآورد گردید.

$$Y = b\,(1-e^{(-ct)}) \qquad \text{رابطه ۳}$$

که در این رابطه b پتانسیل تولید گاز، c نرخ ثابت تولید گاز؛ t زمان و y گاز تولیدی در زمان t بود. مقادیر گاز تولیدی با استفاده از تبدیل فشار به حجم اندازه‌گیری شد (Lopez و همکاران، ۲۰۰۷).

بعد از اتمام آزمون تولید گاز حاصل از مایع شکمبه ۲۰ راس دام مصرف کننده مکمل معدنی، با استفاده از داده‌های گاز ۲۴ ساعت و رابطه‌های ۴ تا ۷ انرژی قابل سوخت و ساز، تجزیه پذیری ماده آلی، ضریب تفکیک پذیری (میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده بخش بر گاز تولیدی)، توده میکروبی و کل اسیدهای چرب کوتاه زنجیر محاسبه شدند. انرژی قابل سوخت و ساز تیمارهای مورد مطالعه با استفاده از رابطه (۴) برآورد گردید (Menke و همکاران، ۱۹۷۹).

[1]- Wheaton Bottle

$ME_{MJ/kg\ DM}=[(۲/۲)+(۰/۱۳۶\times GP)+(+۰/۰۰۵۷CP)+(۰/۰۰۰۲۹\times EE^2)]$ رابطه۴)

که در آن ME انرژی قابل سوخت و ساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)، GP: گاز تولیدی ساعت ۲۴ (میلی لیتر)، CP: پروتئین خام (گرم در کیلوگرم ماده خشک)، و EE: عصاره اتری (گرم در کیلوگرم ماده خشک) بود.

ضریب تفکیک پذیری (نسبت میلی‌گرم ماده‌ی آلی تجزیه شده به میلی‌لیتر گاز تولیدی) با استفاده از رابطه ۵ محاسبه شد (Vercoe و همکارن، ۲۰۱۰).

$PF = c - (a–b)/ IVGP$ رابطه ۵)

در این رابطه، c مادهٔ آلی وزن شده در هر بطری (میلی‌گرم)، a مقدار مواد تجزیه نشده در هر بطری(میلی‌گرم)، b مقدار خاکستر مواد تجزیه نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و IVGP گاز تولیدی است. ماده‌ی آلی تجزیه شده(OMDe) نیز به کمک رابطه ۶ محاسبه شد (Vercoe و همکارن، ۲۰۱۰).

$OMDe\ (mg) = c - (a - b)$ رابطه ۶)

بعد از اندازه‌گیری حجم گاز تولیدی در طی ۲۴ ساعت نگهداری درگرمخانه، محتویات داخل بطری شیشه‌ای ویتن به داخل یک بشر انتقال داده شد و توسط محلول شوینده خنثی و حرارت به مدت یک ساعت در دستگاه مجهز به سرد کننده شسته شد. سپس محتویات داخل محلول شوینده توسط کاغذ صافی بدون خاکستر تصفیه و باقی مانده توسط آون و در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس و به مدت ۱۰ ساعت خشک شد. با کسر نمودن وزن بوته خالی از بوته با محتویات بعد از آون، مقدار مواد تجزیه نشده در هر بطری (a) محاسبه شد. سپس بوته و محتویات داخل آن به کوره انتقال داده شد و در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس مقدار خاکستر آن (b) محاسبه شد. با کسر نمودن مقدار b از a ، ماده آلی تجزیه نشده برحسب میلی‌گرم محاسبه شد. مقادیر توده میکروبی تولیدی و بازده تولید توده میکروبی نیز با استفاده از رابطه ۷ محاسبه شد (Vercoe و همکارن، ۲۰۱۰).

$MM_{(mg)}= [c-(a-b)]-[NG_{(ml)}\times ۲/۲]$ رابطه ۷)

در این رابطه، MM میلی‌گرم توده میکروبی تولید شده، c ماده‌ی آلی وزن شده در هر بطری (میلی‌گرم)، a مقدار مواد تجزیه نشده در هر بطری (میلی‌گرم)، b مقدار خاکستر مواد تجزیه نشده در هر بطری (میلی‌گرم)، NG میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی و ۲/۲ ضریب استوکیومتری است.

تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی و کل اسیدهای چرب زنجیر کوتاه

پس از گرفتن مایع شکمبه از گوسفندان مصرف‌کننده مکمل‌های روی و سلنیوم، مایع شکمبه هر گوسفند با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال رقیق (۱ مایع شکمبه و ۵ اسید) شد. سپس نمونه تهیه شده سانتریفیوژ (۴ درجه سلسیوس، ۱۵۰۰۰ دور، ۱۰ دقیقه) و محلول رویی تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی به وسیله روش فنول- هیپوکلریت و با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین گردید (Broderick و Kang ، ۱۹۸۰).

به منظور تعیین غلظت کل اسیدهای چرب کوتاه زنجیر بلافاصله پس از گرفتن مایع شکمبه از گوسفندان مصرف کننده مکمل‌های روی و سلنیوم، مایع شکمبه هر گوسفند با اسید فسفریک ۲۰ درصد رقیق (۴ مایع شکمبه و ۱ اسید فسفریک)گردید. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه باقی ماند تا پروتئین محلول رسوب کند، سپس سانتریفیوژ (دمای ۴ درجه، ۱۴۰۰۰، ۱۵ دقیقه) شد. محلول رویی را تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. غلظت کل اسیدهای چرب زنجیر کوتاه (میلی‌مول در لیتر) توسط رابطه ۸ (Getachew و همکاران، ۲۰۰۲) و روش Barnett و Reid، (۱۹۵۷) با استفاده از دستگاه مارخام برآورد شد:

$SCFA_{(mmol/L)} = [(۰/۲۲۲\times GP)-۰/۰۰۴۲۵]\times ۱۰۰$ رابطه ۸)

در روش Barnett و Reid (۱۹۵۷) مقدار ۲ میلی‌لیتر از مایع شکمبه تصفیه شده و ۲ میلی‌لیتر از محلول بافر اگزالات (اسید اگزالیک ۵ درصد و اگزالات پتاسیم ۱۰ درصد با نسبت ۱ به ۱، به دستگاه شیشه‌ای مارخام تزریق شد. در حین حرارت به دستگاه، بقایای تقطیر شده در ارلن داخل حمام یخ جمع گردید. سپس به محتویات داخل ارلن ۳ تا ۴ قطره فنل فتالئین اضافه شده و در پایان

محلول داخل ارلن توسط سود ۰/۰۱ نرمال تیتر شد. بعد از افزودن سود رنگ محلول باید کاملا صورتی شود. غلظت کل اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر بر اساس رابطه ۹ محاسبه گردید.

رابطه ۹) $\text{VFA mmol/L} = \left[\left(\frac{N\times 0.01}{RF}\right)\times 1.2\right]\times 1000$

در این رابطه N حجم سود مصرفی به هنگام تیتراسیون، RF حجم مایع شکمبه که ۱ میلی‌لیتر است، ۱/۲ ضریب رقت مایع شکمبه و ۱۰۰۰ ضریب تبدیل غلظت اسید چرب کوتاه زنجیر در لیتر است.

شمارش جمعیت پروتوزوآ

مایع شکمبه با محلول فرمال سالین[2] (مقدار ۸/۱ گرم NaCl در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و سپس مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر فرمالین ۳۶ درصد به آن افزوده شد) با نسبت ۱ به ۵ ترکیب شد و تا روز شمارش در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. جمعیت پروتوزوآی مژکدار سه زیر خانواده *Entodiniinae*، *Ophryscolecinae*، *Diplodiniinae* و خانواده *Isotrichidae* (Dehority، ۲۰۰۳) با استفاده از لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری (مدل Nikon, YS 100) با بزرگ نمایی ۱۰x در ۹ تکرار برای هر تیمار شمارش گردید. تعداد پروتوزوآ در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه بر اساس رابطه ۱۰ محاسبه شد.

رابطه ۱۰) $NPml = \frac{N}{[areamm\,.\,Dmm.\frac{1}{n}]}\times 1000$

که در این رابطه؛ NP تعداد پروتوزوآی شمارش شده در هر میلی‌لیتر، N تعداد پروتوزوآ در هر بار شمارش لام، area mm مساحت هر بخش لام (۱ میلی متر مربع)، Dmm عمق هر بخش لام (۰/۱ میلی متر) و $\frac{1}{n}$ ضریب رقت (یک پنجم) است.

آزمایش دوم

در آزمایش دوم، از پنج راس گوسفندان گروه شاهد و در حالت ناشتا مایع شکمبه گرفته و توسط فلاسک به آزمایشگاه منتقل شد. سپس بر اساس آزمون تولید گاز برون‌تنی فراسنجه‌های تخمیر مطالعه شد (Menke و Steingass ، ۱۹۸۸). در این آزمایش مکمل‌های آلی روی وسلنیوم به بطری های ویتن حاوی ۳۰ میلی لیتر مایع شکمبه بافری افزوده شد.آزمون گاز در چهار گروه۱) شاهد (مایع شکمبه بدون روی و سلنیوم)، ۲) افزودن ۳۰۰ میلی-گرم سلنومتیونین، ۳) افزودن ۴۰۰ میلی‌گرم روی-متیونین و ۴) افزودن همزمان ۴۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم روی - سلنیوم به ازاء هر ۳۰ میلی لیتر انجام شد. خوراک داخل بطری های ویتن همان جیره پایه مصرفی گوسفندان شاهد بود.

برای هر تیمار تعداد ۱۰ تکرار (۱۰ بطری ۱۲۰ میلی لیتری) تهیه گردید. این آزمایش در دو سری و برای هر سری تعداد ۴۵ بطری ۱۲۰ میلی‌لیتری آماده (۴۰ تیمارها، ۵ بلانک) شد. یک سری از بطری‌ها برای آزمون ۹۶ ساعت و سری دیگری برای آزمون ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. محیط‌های تخمیر یا همان بطری‌های ویتن[3] ۱۲۰ میلی‌لیتری و محتویات داخل آن در دمای ۳۹ درجه سلسیوس و به مدت ۹۶ و ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

کینتیک تخمیر گاز ۹۶ ساعت، از طریق ثبت گازهای ساعات صفر، ۳، ۶ ، ۹ ، ۱۲ ، ۲۴ ، ۴۸ ، ۷۲ و ۹۶ و رابطه ۱ (Ørskov و McDonald، ۱۹۷۹) و نرم افزار Fit cruve 6.0 برآورد گردید.

رابطه ۱۱) $Y= b\,(1-e^{(-ct)})$

که در این رابطه، b پتانسیل تولید گاز، c نرخ ثابت تولید گاز؛ t زمان، y گاز تولیدی در زمان t است. مقادیر گاز تولید با استفاده از تبدیل فشار به گاز اندازه‌گیری شد (Lopez و همکاران، ۲۰۰۷).

بعد از اتمام آزمون گاز ۲۴ ساعته و ثبت گاز تولیدی (Menke و Steingass، ۱۹۸۸)، مایع شکمبه برای اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی (Broderick و Kang، ۱۹۸۰).، اسیدهای چرب فرار (Barnett و Reid، ۱۹۵۷) و جمعیت پروتوزوآیی (Dehority، ۲۰۰۳) تهیه گردید.

تجزیه آماری

داده‌های حاصل از هر دو آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 21برای ۴ تیمار (شاهد، روی-متیونین، سلنومتیونین و تیمار حاوی هر دو مکمل روی و سلنیوم)در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه گردید. داده‌ها بر اساس مدل آماری

[2]-Formal Saline

[3]- WheatonBottle

$Y_{ijk}=\mu+T_i+\varepsilon_{ijk}$ تجزیه شدند که در آن، Y_{ijk} مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار و ε_{ijk} مقدار خطای باقیمانده بود. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. داده‌های حاصل از نتایج دو روش با استفاده از روش آزمون t مستقل (جفت نشده) مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

آزمایش اول

نتایج فراسنجه‌های تولید گاز حاصل از تخمیر آزمایشگاهی نمونه توسط مایع شکمبه گوسفندان مصرف کننده مکمل‌های آلی روی و سلنیوم در تیمارهای مختلف (جدول ۳) نشان می‌دهد که با افزودن سلنومتیونین، روی-متیونین، و روی-سلنیوم به جیره، نرخ ثابت تولید گاز در دو تیمار سلنیوم و تیمار روی نسبت به تیمار شاهد کاهش (p = ۰/۰۰۱) داشت.

گاز تولیدی در فرایند تخمیر بیشتر متعلق به هضم و تجزیه‌پذیری کربوهیدرات‌های سوبسترا بوده (Vercoe و همکاران، ۲۰۱۰) و لذا در هر سه تیمار دریافت کنندهٔ مکمل روی، سلنیوم و روی-سلنیوم؛ کاهش گاز تولیدی ۲۴ ساعت مؤید کاهش تخمیر سوبسترا است. چون افزودن روی به مقدار بیش از ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک سبب کاهش فعالیت باکتری‌های شکمبه (Martinez و Church، ۱۹۷۰) شده و استفاده از ۵۰،۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم روی در هر میلی‌لیتر در تخمیر ۲۴ ساعت برون تنی نیز سبب کاهش فعالیت باکتری‌های سلولولایتکی شده است (Eryavua و Dehority، ۲۰۰۹)، در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد مهار تخمیر در ساعت ۲۴ در هر سه گروه گوسفندان دریافت کننده مواد معدنی، ناشی از اثرات سمی این مواد معدنی (روی و سلنیوم به تنهایی و ترکیب روی-سلنیوم) در سطح ۴۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم خوراک برای عوامل موثر بر تخمیر بوده است. گرچه بر خلاف این نتایج ؛ در بررسی Eryavua و Dehority (۲۰۰۹) در تخمیر ۴۸ ساعت؛ روی تاثیری بر باکتری‌های سلولولایتیک نداشته است و برخی از مطالعات نیز افزودن ۴۰ میلی‌گرم روی-متیونین به جیره پایه بره‌های سنجابی تاثیری بر جمعیت پروتوزوآی کل نداشته است (کاظمی، ۱۳۹۴).

در تحقیق حاضرگاز تولیدی در ساعات ۳، ۶ ، ۹ ، ۱۲ ، ۲۴ ، ۴۸ ، ۷۲ و ۹۶ در هر سه تیمار دارای افزودنی روی-متیونین، سلنومتیونین و روی- سلنیوم کاهش یافته‌اند (p =۰/۰۰۱) (نمودار ۱)که نشان دهنده مهار فرایند تخمیر و هضم پذیری سوبستراست.

جدول ۳: فراسنجه‌های تولید گاز آزمایشگاهی حاصل از مایع شکمبه گوسفندان تغذیه‌شده با مکمل‌های روی-متیونین و سلنومتیونین آنها.

فراسنجه	تیمار				سطح معنی‌داری	
	شاهد	سلنومتیونین	روی-متیونین	سلنیوم-روی	SEM	
b (میلی لیتر)	۴۵/۵۵^{ab}	۴۲/۹۴^{c}	۴۳/۹۳^{bc}	۴۷/۵۶^{a}	۰/۴۷۵	۰/۰۰۱
c (در ساعت)	۰/۰۴۴۴^{a}	۰/۰۴۱۹^{b}	۰/۰۴۱۵^{b}	۰/۰۴۶۵^{a}	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۱
تولید گاز ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)	۳۷/۹۸^{a}	۲۹/۷۰^{c}	۲۶/۸۴^{d}	۳۳/۲۸^{b}	۰/۷۰۱	۰/۰۰۱

b = پتانسیل تولید گاز ،*c*= نرخ ثابت تولید گاز

نمودار ۱: منحنی گاز تولیدی در آزمون گاز در طی زمان ۳ تا ۹۶ ساعت با استفاده از مایع شکمبه گوسفندان چهار تیمار

انرژی قابل سوخت و ساز، قابلیت هضم ماده‌ی آلی، نیتروژن آمونیاکی، ضریب تفکیک‌پذیری، پروتئین میکروبی، و اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در جدول ۴ نشان داده شده است. در تیمارهای حاوی مکمل سلنیوم و روی؛ هم زمان با کاهش گاز تولیدی ساعت ۲۴، انرژی قابل سوخت و ساز (مگاژول در هر کیلوگرم ماده خشک) کاهش یافت (p=۰/۰۰۱). لذا هر چه که ماده‌ی آلی تجزیه شده کمتر شده است انرژی قابل سوخت و ساز نیز کمتر شده است. هرچند مقادیر انرژی قابل سوخت و ساز و ماده‌ی آلی هضم شده در تیمار روی-سلنیوم کمتر از شاهد می‌باشد، ولی در مقایسه با تیمار حاوی روی-متیونین و تیمار حاوی سلنومتیونین (تیمار دوم و سوم) کاهش کمتری را در صفات مذکور به دنبال داشته است (p= ۰/۰۰۱).

تحقیقات نشان داده است در شرایط برون‌تنی، افزودن روی بیش از حد نیاز دام به مقدار۱۵۰-۵۰ گرم در میلی‌لیتر مایع شکمبه گوسفند (Eryavuz و Dehority، ۲۰۰۹)، ۱۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه (Bonhomme و همکاران، ۱۹۷۹) و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مایع شکمبه (Martinez و Church ، ۱۹۷۰) قابلیت هضم سلولز را کاهش داده است. چون تجزیه-پذیری ماده آلی و تولید انرژی قابل سوخت و ساز رابطه مستقیم دارند (NRC،۲۰۰۷)؛ لذا در مطالعه حاضرکاهش قابلیت هضم ماده آلی سبب کاهش تولید انرژی قابل سوخت و ساز شده است. بررسی‌ها نشان داده روی در غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در هر میلی لیتر فقط در تخمیر ۲۴ ساعت با سطح سلول باکتری‌های سلولولایتیک متصل شده و باکتری را مهار می‌کند؛ و از آنجایی که هضم سلولز وابسته به اتصال و چسبندگی‌مستقیم باکتری به سطح سلولز است؛ مهار باکتری توسط روی، سبب کاهش قدرت اتصال و در نهایت کاهش قابلیت هضم ماده آلی می‌گردد (Eryavuz و Dehority، ۲۰۰۹). گرچه بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، عصاره اتری، aNDF و ADF در کل دستگاه گوارش گاوها در دوگروه دریافت کننده‌ی ۱۵۰و ۳۰۰ میلی‌گرم سلنیوم- مخمر در کیلوگرم ماده خشک (Wang و همکاران، ۲۰۰۹) و در بره‌های مهربان دریافت کننده ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم آلی (علیمحمدی، ۱۳۹۱) نسبت به شاهد افزایش یافته است.

به نظر می‌رسد تفاوت روش محاسبه قابلیت هضم در این مطالعات (روش قابلیت هضم دام در باکس‌های متابولیکی) با مطالعه حاضر (محاسبه بر اساس آزمون گاز و آزمایشگاهی) از علت‌های تفاوت نتایج باشد.

نیتروژن آمونیاکی و تولید پروتئین میکروبی

نیتروژن آمونیاکی همه گروه‌های آزمایشی به غیر از گوسفندان دریافت کننده سلنومتیونین (۳۰۰ میلی‌گرم سلنیوم) در دامنه غلظت طبیعی آمونیاک در مایع شکمبه نشخوارکنندگان (۳۰۰-۸۵ میلی‌گرم در لیتر) بود (Mcdonald و همکاران؛ ۲۰۱۰). غلظت نیتروژن آمونیاکی بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر برای رشد بهینه میکروب‌های شکمبه ضروری است (Satter و Slyter، ۱۹۷۴)که این حد ضروری در همه تیمارها وجود داشت. در مقایسه با شاهد، تیمار حاوی سلنیوم به تنهایی و تیمار حاوی دو عنصر سلنیوم-روی؛ کاهش غلظت آمونیاک داشته‌اند (p =۰/۰۳) ولی تیمار دارای روی به تنهایی تفاوتی با شاهد نداشت. آمونیاک تولیدی در محیط تخمیر نتیجه فرایند دی‌آمیناسیون اسیدهای آمینه، افزایش فعالیت باکتری‌های تولید کننده آمونیاک زیاد(HAP) (McIntosh و همکاران، ۲۰۰۳) و افزایش تجزیه اوره توسط آنزیم اوره‌آز (Arelovich و همکاران،۲۰۰۰) در محیط تخمیر است.

در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد تنها سلنومتیونین توانسته است با تاثیر بر حداقل یکی از فرایندهای فوق الذکر سبب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی گردد. گرچه چون پروتئین میکروبی افزایش یافته است احتمال می‌رود تبدیل منابع نیتروژنی به پروتئین میکروبی سبب کاهش نیتروژن آمونیاکی باشد. مطابق با نتایج بررسی حاضر مطالعات نشان داده است که افزودن ۴۷۰ میلی‌گرم روی در گوساله (Arelovich و همکاران، ۲۰۰۰)، افزودن ۱۱۴۲ میلی‌گرم روی در تلیسه‌ها (Froetschel و همکاران، ۱۹۹۰)، سلنیوم آلی در سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در هر کیلو ماده خشک در گاو (Wangو همکاران،۲۰۰۹) و استفاده از ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در هر کیلوگرم ماده خشک مصرفی در گوسفندان مهربان (علیمحمدی، ۱۳۹۱) سبب کاهش غلظت آمونیاک در شکمبه دام شده است.

در بررسی حاضر تولید پروتئین میکروبی تحت تاثیر روی-متیونین، سلنومتیونین و روی-سلنیوم افزایش نشان داد که در بهبود ضریب تفکیک پذیری نیز نمایان شده است. این دو شاخص رابطه مستقیم داشته و افزایش ضریب تفکیک پذیری نشان دهنده تولید پروتئین میکروبی بیشتر است (Vercoe و همکاران، ۲۰۱۰). تولید پروتئین میکروبی در محیط تخمیر مستلزم فعالیت باکتریایی، حضور منابع نیتروژنه و انرژی و همزمان‌سازی انرژی و نیتروژن در محیط تخمیر است (Bach و همکاران، ۲۰۰۵).

در تحقیق حاضر نیز عنصر روی اثر کاهشی بر مقدار آمونیاک داشته و مسیر متابولیسم نیتروژن را به جای افزایش آمونیاک به سمت تولید پروتئین میکروبی هدایت کرده است. مشابه با تحقیق حاضر، افزودن مکمل سلنیوم آلی توانسته است از طریق افزایش مشتقات پورینی؛ تولید پروتئین میکروبی را در شکمبه افزایش دهد (Xun و همکاران، ۲۰۱۲). به نظر می‌رسد چون سلنیوم می‌تواند جمعیت میکروبی شکمبه و فعالیت آن‌ها را بالا ببرد (Shi و همکاران، ۲۰۱۱؛ Faixova و همکاران، ۲۰۰۷) منجر به افزایش بازدهی نیتروژن آمونیاکی (Shi و همکاران، ۲۰۱۱) شود.

افزودن سلنیوم آلی به میزان ۴ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک جیره گوسفند، فعالیت باکتری‌ها و آنزیم‌های پروتئولایتیک را افزایش داده، که توانسته است جمعیت میکروبی شکمبه را بالا برده و بازدهی‌نیتروژن آمونیاکی را افزایش دهد (Xunو همکاران، ۲۰۱۲). همچنین افزایش در سنتز پروتئین میکروبی با افزودن سلنیوسیستئین (۰/۳، ۳ و ۶ گرم در کیلوگرم ماده خشک) (Shi و همکاران،۲۰۱۱) گزارش شده است.

ضریب تفکیک پذیری در مقایسه با شاهد در هر سه تیمار افزایش (p=۰/۰۰۱) یافت و تیمار روی-متیونین، سلنومتیونین و روی-سلنیوم به ترتیب بیشترین مقدار را داشتند. پروتئین میکروبی نیز متناسب با ضریب تفکیک پذیری تغییر یافت (p =۰/۰۰۱).

در خصوص بهبود یا عدم بهبود تخمیر در شکمبه یا محیط تخمیر نباید بر اساس هر یک از دو شاخص گاز تولیدی ۲۴ ساعت و

ماده آلی تجزیه شده به تنهایی، تصمیم‌گیری کرد (Vercoeو همکاران، ۲۰۱۰). لذا شاخص ترکیبی ضریب تفکیک پذیری (نسبت ماده آلی تجزیه شده بر گاز تولیدی در ساعت ۲۴) ارایه شده است (Vercoeو همکاران، ۲۰۱۰).چون به ازاء هر واحد ماده آلی هضم شده گاز کمتری تولید شده است، لذا این ضریب بهبود داشته و بر اساس این شاخص افزودن دو مکمل روی-متیونین و سلنومتیونین سبب بهبود تخمیر شده است. گرچه کاهش گاز تولیدی، قابلیت هضم و انرژی سوخت وساز را نیز باید لحاظ نمود.

کل اسیدهای چرب زنجیر کوتاه

غلظت کل اسیدهای چرب زنجیر کوتاه به روشBarnett و Reid (۱۹۵۷) تغییری نداشت ولی به روش رابطه ۷ (Getachew و همکاران، ۲۰۰۲) در گوسفندان هر سه تیمار دریافت کننده سلنومتیونین و روی-متیونین نسبت به شاهد کاهش داشت (p = ۰/۰۰۱). در آزمون گاز، تولیدگاز نتیجه‌ی تخمیر کربوهیدرات‌ها به استات، پروپیونات و بوتیرات است (Vercoe و همکاران، ۲۰۱۰). لذا در بررسی حاضر چون قابلیت هضم ماده آلی کاهش داشته، اسید چرب نیز کمتر شده است. در مقایسه بین دو روش، چون در روش معادله ۷ بین تغییرات کل اسیدهای چرب فرار با گاز تولیدی ساعت ۲۴ رابطه صحیح و مورد انتظار وجود دارد، همچنین مقادیر برآورد شده در این رابطه (۷) در محدوده مطلوب آن (۱۵۰-۷۰ میلی‌مول در لیتر) (McDonald و همکاران، ۲۰۱۰) قرار دارد، به نظر می‌رسد روش معادله ۷ دقیق و مورد اعتماد باشد. گرچه تجربیات گذشته نگارندگان نیز نشان داده است در روش Barnett و Reid (۱۹۵۷) محلول سود کاربردی باید تازه تهیه و در یخچال نگهداری گرددکه در این آزمایش نیز رعایت شد. در غیر این صورت مقدار مصرف سود بیشتر و غلظت اسیدهای چرب فرار کل افزیش می‌یابد. برخی بررسی‌ها نشان داده است کل اسیدهای چرب فرار در تلیسه‌های جرسی دریافت کننده ۱۱۴۲ میلی‌گرم روی به مدت ۱۴ روز؛ (Froetschelو همکاران، ۱۹۹۰) تغییراتی نداشته است. ولی افزودن روی به مقدار بیش از احتیاجات دام سبب تغییر تخمیر شکمبه‌ای انرژی و افزایش انرژی از منابع اسیدهای چرب فرار شد (Arelovich و همکاران،۲۰۰۰؛Bateman وهمکاران،۲۰۰۴). در پژوهشی استفاده از دو نوع مکمل سلنیوم در گوسفندان؛ افزایش اسید چرب کل زنجیر کوتاه را در گروه دریافت کننده سلنیوم آلی نسبت به دو گروه دیگر به دنبال داشته است (Xun و همکاران، ۲۰۱۲).

جدول ٤: تاثیر روی-متیونین و سلنومتیونین بر قابلیت هضم، انرژی و فراسنجه‌های تخمیری گوسفندان در روش درون‌تنی (آزمایش اول).

فراسنجه	تیمار					سطح معنی داری
	شاهد	سلنومتیونین	روی-متیونین	سلنیوم-روی	SEM	
انرژی قابل سوخت و ساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)	۷/۸۳[a]	۶/۳۱[c]	۵/۹۳[d]	۶/۷۹[b]	۰/۰۹۶	۰/۰۰۱
قابلیت هضم ماده‌ی آلی (درصد)	۴۸/۳۲[a]	۴۱/۲۹[c]	۳۹/۱۹[d]	۴۴/۴۷[b]	۰/۶۲۳	۰/۰۰۱
ماده‌ی آلی هضم شده (میلی‌گرم/۲۰۰میلی‌گرم)	۹۴/۸۷[a]	۸۴/۱۱[b]	۷۸/۲۳[c]	۸۸/۲۷[b]	۱/۲۴۶	۰/۰۰۱
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در لیتر)	۹۴/۸۷[a]	۶۵/۲۵[b]	۸۸/۳۳[a]	۷۲/۵۵[b]	۴/۳۲	۰/۰۳۰
ضریب تفکیک پذیری (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	۲/۵۷[b]	۲/۷۹[a]	۲/۸۷[a]	۲/۶۷[a]	۰/۰۲۱	۰/۰۰۱
پروتئین میکروبی (میلی‌گرم/ گرم ماده‌خشک)	۱۴/۰۲[d]	۱۷/۳۶[b]	۱۸/۳۵[a]	۱۵/۸۵[c]	۰/۲۹۵	۰/۰۰۱
کل اسیدهای چرب کوتاه زنجیر						
روش بارنت و رید، ۱۹۵۷ (میلی مول در لیتر)	۳۷/۰۰	۴۵/۰۰	۳۸/۰۰	۴۵/۸۰	۴/۵۹	۰/۷۴
رابطه ۷ گتچو، ۲۰۰۲ (میلی مول در لیتر)	۸۲/۹۰[a]	۶۵/۶۰[c]	۶۰/۰۰[d]	۷۳/۲۰[b]	۱/۵۵	۰/۰۰۱

این محققین بیان داشته‌اند که سلنیوم به طور نسبی فعالیت میکروبی شکمبه را در جهت تولید پروپیونات بهبود می‌دهد. افزودن مقدار ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم آلی در هر کیلوگرم ماده خشک به جیره گوسفندان مهربان، افزایش غلظت اسید چرب کل را به همراه داشته (علیمحمدی، ۱۳۹۱) و استدلال نموده‌اند که افزودن سلنیوم آلی می‌تواند رشد و فعالیت باکتری‌های شکمبه را افزایش و بنابراین تخمیر را بهبود ببخشد.

مصرف ماده خشک و مواد مغذی و تولید متان

مصرف ماده خشک، انرژی قابل سوخت و ساز، پروتئین خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و عصاره اتری تحت تأثیر عناصر روی-متیونین و سلنومتیونین در مقایسه با تیمار شاهد تغییری نکردند (جدول ۵). بنابراین افزودن روی و سلنیوم آلی در مقادیر دو برابر نیاز دام تاثیر مثبتی بر مقدار خوراک مصرفی گوسفندان نداشت. ماده خشک مصرفی در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۰۹) تحت تأثیر افزودن سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم مخمری در هرکیلو ماده خشک جیره قرار نگرفت. در پژوهش دیگری نیز افزودن مکمل روی در جیره بزهای آنقوره (۴۰ میلی‌گرم مکمل روی درجیره پایه حاوی ۲۲ میلی‌گرم روی در کیلوگرم ماده‌ی خشک) (Puchala و همکاران، ۱۹۹۹) و افزودن ۲۰ میلی‌گرم مکمل روی به جیره‌ی پایه حاوی ۳۴ میلی‌گرم بز ها (Garg و همکاران، ۲۰۰۸) تاثیری بر ماده خشک مصرفی نداشته است.

گاز متان تخمینی در دام‌های زنده که بر اساس دو معادله (Ellis و همکاران، ۲۰۰۷) برآورد شد تحت تأثیر مکمل‌های روی و سلنیوم قرار نگرفت (جدول ۵). تولید متان در دام ناشی از فرایند متانوژنسیس و متابولیسم آرکایاها است (Morgavi و همکاران، ۲۰۱۰). عواملی هم‌چون ماده خشک مصرفی، سوبسترای فورمات (Formate)، دی اکسید کربن، ترکیباتی که حاوی گروه متیل هستند و استات (Morgavi و همکاران، ۲۰۱۰) در تولید متان موثر می‌باشند. پس ملاحظه می‌گردد که تغذیه منابع آلی گران قیمت روی و سلنیوم در گوسفند تأثیر مثبتی بر کاهش آلودگی زیست‌محیطی مربوط به تجمع متان نخواهد داشت که نکته مهمی در تغذیه عملی نوین می‌باشد.

جدول۵: تاثیر روی و سلنیوم بر خوراک مصرفی و تولید متان (مگاژول/ روز)گوسفندان به روش درون تنی.

فراسنجه	تیمار				سطح	
مصرف ماده مغذی	شاهد	سلنومتیونین	روی-متیونین	سلنیوم-روی	SEM	معنی‌داری
ماده خشک (کیلوگرم/ روز)	۱/۵۰	۱/۵۷	۱/۵۶	۱/۵۷	۰/۴۰۳	۰/۶۷۷
انرژی قابل سوخت و ساز (مگاژول/ روز)	۶/۳۱	۶/۵۷	۶/۵۶	۶/۵۷	۰/۱۸۴	۰/۹۵۶
پروتئین خام (کیلوگرم/ روز)	۰/۱۶	۰/۱۷	۰/۱۷	۰/۱۷	۰/۰۰۵	۰/۷۲۷
الیاف نامحلول در شوینده‌ی خنثی (کیلوگرم/ روز)	۰/۷۱	۰/۷۴	۰/۷۴	۰/۷۴	۰/۰۲۱	۰/۶۹۶
عصاره اتری (کیلوگرم/ روز)	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۰۲	۰/۶۷۷
گاز متان به صورت معادل انرژی (مگاژول/ روز)						
رابطه ۱	۴/۹۵	۴/۹۹	۴/۹۹	۴/۹۹	۰/۰۲۹	۰/۶۷۱
رابطه ۲	۴/۵۶	۴/۵۹	۴/۶۰	۴/۶۰	۰/۰۲۵	۰/۶۷۴

رابطه ۱) $CH4_{(MJ/d)} = ۳/۹۶(\pm ۱/۱۸) + ۰/۵۶۱(\pm ۰/۱۳۰) \times DMI_{(kg/d)}$

رابطه ۲) $CH4_{(MJ/d)} = ۲/۷۰(\pm ۱/۳۸) + ۱/۱۶(\pm ۰/۲۷۱) \times DMI_{(kg/d)} - ۱۵/۸(\pm ۶/۸۶) \times EE_{(kg/d)}$

جمعیت پروتوزوآی شکمبه

جمعیت کل پروتوزوآ در حضور روی- متیونین، سلنیومتیونین و روی-سلنیوم نسبت به گروه شاهد (p= ۰/۰۰۱) افزایش داشت. بیشترین افزایش را جمعیت زیر خانواده انتودینینه‌ها نشان دادند. جمعیت زیر خانواده ایزوتریشیدا، افریواسکولسینه و دیپلودینینه تحت تاثیر سلنیوم و روی قرار نگرفته‌اند. فرض بر این است که دستگاه گوارش محل اصلی تولید رادیکال‌های آزاد در حیوانات است (Surai، ۲۰۰۲)؛ و سلنیوم دارای خواص آنتی‌اکسیدانی برای پروتوزآ است (Mihaliková و همکاران، .۲۰۰۵). مشخص شده است که سلنیوم تاثیرات فیزیولوژیک خود را از طریق سلنوپروتئین‌ها اعمال نموده و کمبود آن می‌تواند بیان mRNA را کاهش دهد (Juszczuk-Kubiak و همکاران ، ۲۰۱۶). لذا گروه‌های دریافت کننده سلنیوم ممکن است فعالیت سلنوآنزیم بیشتری برای پروتوزوآ داشته باشند (Mihaliková و همکاران، ۲۰۰۵) و به نظر می‌رسد چنین شرایطی سبب افزایش تعداد پروتوزآ شده باشد.

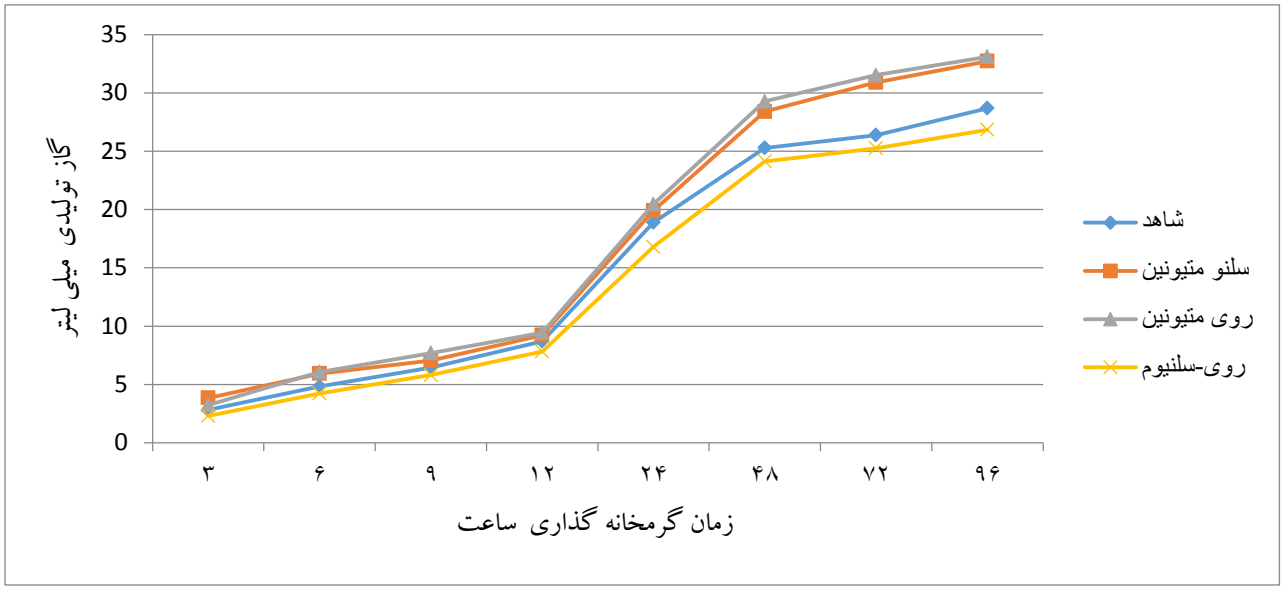
در مطالعه‌ی Froetschel و همکاران(۱۹۹۰) افزودن روی (۱۱۴۲ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک) در روز اول و ۱۲ به ترتیب سبب کاهش و افزایش تعداد پروتوزوآی شکمبه گوساله پرواری شد. همچنین افزودن مکمل سلنیوم آلی (۳۱۰ میکروگرم در کیلوگرم ماده خشک) به یک جیره حاوی ۷۰ میکروگرم در کیلوگرم ماده خشک سلنیوم در بره‌های ۴ ماهه، سبب افزایش جمعیت پروتوزوآی افریواسکولسینه و جنس *Diploplastron* در مقایسه با تیمار شاهد شده است (Mihaliková و همکاران، . ۲۰۰۵). گرچه سلنیوم معدنی به تنهایی (۳۱۰ میکروگرم در کیلوگرم ماده خشک) و به همراه ویتامین E نیز جمعیت زیرگونه‌های دیپلودینیوم، افریواسکولسینه و کل را افزایش داده است (Naziroğlu و Aksakal، ۱۹۹۷).

جدول ٦: تاثیر سلنومتیونین و متیونین-روی بر جمعیت پروتوزوآیی (۱۰°×در میلی‌لیتر) مایع شکمبه درون تنی (آزمایش اول).

پروتوزوآ	تیمار				سطح	
	شاهد	سلنومتیونین	روی-متیونین	روی-سلنیوم	SEM	معنی داری
زیر خانواده						
ایزوتریشیده	۰/۲۷۳	۰/۳۲۴	۰/۳۴۳	۰/۲۵۰	۰/۰۲۳	۰/۳۱۶
انتودینینه	۵/۱۸۴[b]	۷/۴۹۳[a]	۷/۳۵۹[a]	۷/۹۵۳[a]	۰/۱۸۶	۰/۰۰۱
دیپلودینینه	۰/۱۴۴	۰/۱۲۵	۰/۱۳۸	۰/۱۲۷	۰/۰۱۴	۰/۹۶۲
افریواسکولسینه	۰/۰۴۴۴	۰/۰۸۳۳	۰/۰۱۲۵	۰/۰۷۷۷	۰/۰۱۱	۰/۰۸۸
پروتوزوآ کل	۵/۶۴۵[b]	۸/۸۰۲[a]	۷/۸۵۲[a]	۸/۴۰۸[a]	۰/۲۰۵	۰/۰۰۱

بخش دوم

نتایج فراسنجه‌های تولید گاز (جدول ۷) و منحنی تولید گاز در ساعات مختلف تا ۹۶ ساعت در نمودار ۲ نشان می‌دهد که افزودن مواد معدنی (سلنومتیونین، روی-متیونین،روی-سلنیوم) هیچ گونه تأثیری بر فراسنجه‌ها نداشت (p>۰/۰۵).



نمودار ۲: منحنی‌های تولید گاز آزمایشگاهی در طی زمان ۳ تا ۹۶ ساعت با استفاده از مایع شکمبه گوسفندان شاهد و افزودن مکمل‌های روی و سلنیوم در آزمایشگاه.

جدول ۷: تاثیر روی-متیونین و سلنومتیونین بر فراسنجه‌های تولید گاز برون‌تنی(*in vitro*) با استفاده از مایع شکمبه گوسفندان گروه شاهد.

فراسنجه	تیمار				سطح معنی‌داری
	شاهد	سلنومتیونین	روی-متیونین	سلنیوم-روی	SEM	
b (میلی‌لیتر)	۳۳/۲۱	۳۵/۸۶	۳۲/۸۹	۳۲/۷۱	۱/۲۷۵	۰/۹۶۰
c (در ساعت)	۰/۰۳۹۶	۰/۰۳۹۸	۰/۰۵۰۷	۰/۰۳۸۸	۰/۰۰۴	۰/۷۸۹
تولید گاز ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلیگرم ماده خشک)	۱۸/۸۹	۱۹/۹۰	۲۰/۴۵	۱۶/۷۹	۰/۹۵۲	۰/۵۵۰

b = پتانسیل تولید گاز، *c* = نرخ ثابت تولید گاز

جدول ۸: تاثیر روی-متیونین و سلنومتیونین بر فراسنجه‌های تخمیری برون‌تنی(*in vitro*) با استفاده از مایع شکمبه گوسفندان گروه شاهد.

فراسنجه	تیمار				سطح معنی داری
	شاهد	سلنومتیونین	روی-متیونین	سلنیوم-روی	SEM	
انرژی قابل سوخت و ساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)	۶/۸۴	۷/۸۶	۷/۳۹	۷/۱۰	۰/۳۴۴	۰/۷۹۶
قابلیت هضم مادهی آلی (درصد)	۲۹/۹۲	۳۲/۶۲	۳۱/۵۹	۲۹/۸۷	۰/۹۹۴	۰/۷۳۲
مادهی آلی هضم شده (میلی‌گرم/۲۰۰میلی‌گرم)	۵۹/۸۵	۶۵/۲۶	۶۳/۱۹	۵۹/۷۳	۱/۹۸۹	۰/۷۳۲
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در لیتر)	۲۳۳/۹۶[a]	۲۲۸/۳۶[a]	۲۵۷/۸۷[a]	۱۱۹/۵۷۰[b]	۱۵/۹۴	۰/۰۰۱
ضریب تفکیک پذیری (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	۳/۷۸	۳/۳۶	۳/۴۶	۳/۶۷	۰/۱۶۰	۰/۷۶۲
پروتئین میکروبی (میلی‌گرم/ گرم ماده‌خشک)	۲۲/۷۶	۲۱/۴۸	۲۱/۹۶	۲۲/۷۸	۰/۴۷۲	۰/۷۳۴
pH	۶/۹۶[b]	۷/۰۲[ab]	۷/۰۸[ab]	۷/۱۴[a]	۰/۰۲۱	۰/۰۴۸
اسیدهای چرب کوتاه زنجیر						
روش بارنت و رید، ۱۹۵۷ (میلی مول در لیتر)	۴۵/۰۰	۵۷/۶	۶۱/۲۰	۵۱/۶۰	۳/۸۲۹	۰/۴۸۰
رابطه ۷ گنچو، ۲۰۰۲ (میلی مول در لیتر)	۳۶/۸	۴۳/۷	۴۱/۲	۳۶/۸	۲/۴	۰/۷۲۲

به غیراز نیتروژن آمونیاکی که در تیمار روی- سلنیوم کاهش (p=۰/۰۰۱) و pH که در همه تیمارها افزایش (p=۰/۰۴۸) نشان داد (جدول ۸)، سایر صفات در مقایسه با شاهد تغییری نداشتند.تولید آمونیاک در شکمبه به دلیل فعالیت باکتری‌های پروتئولیتیک و باکتری‌های تولید کننده آمونیاک بالا (Hyper-ammonia producing) (McIntosh و همکاران، ۲۰۰۳) است. حضور روی- سلنیوم در محیط تخمیر ممکن است به وسیله یکی از طرق کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز (Hussain و Cheeke، ۱۹۹۵)، کاهش باکتری‌های تولید کننده آمونیاک (Arelovich و همکاران،۲۰۰۰؛McIntosh و همکاران،

۲۰۰۳) و باند شدن با پروتئین و تشکیل کمپلکس پروتئین- روی یا پروتئین سلنیوم سبب کاهش نیتروژن آمونیاکی گردد. نتایج مشابهی نیز مبنی برکم شدن نیتروژن آمونیاکی در حضور روی (کاظمی ۱۳۹۴) به روش تخمیر برون‌تنی مایع شکمبه گوسفند گزارش شده است.

افزودن مکمل‌های روی-متیونین و سلنومتیونین، pH را نسبت به گروه شاهد افزایش داد؛ ولی در همه سطوح، pH در دامنه مطلوب و طبیعی (۷/۰-۶/۷) برای فعالیت باکتری‌ها قرار داشت (Russel و Wilson، ۱۹۹۶). لذا تغییرات به وجود آمده در فراسنجه‌های تخمیر تحت تاثیر حالت اسیدی- قلیایی محیط قرار نگرفته است. در تیمار چهارم (سلنیوم-روی) نیز شاخص pH نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت (p = ۰/۰۴۸). در تیمار چهارم (مخلوط روی و سلنیوم) نیز احتمالاً کاهش مقدار گاز در محیط تخمیر و در نهایت کاهش غلظت H_2 از علل افزایش قلیایی محیط می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داده است که انتودینینه‌ها اسید لاکتیک را مصرف نموده و تولید پروپیونات می‌کنند، لذا مانع کاهش pH محیط می‌شوند. بنابر این احتمالاً افزایش جمعیت انتودینینه‌ها یکی از علل افزایش pH محیط می‌تواند باشد (Jouany و Ushida، ۱۹۹۹).

در مقایسه با تحقیقات دام زنده، گزارشات کمتری در خصوص افزودن روی و سلنیوم به محیط کشت در شرایط آزمایشگاه در دسترس می‌باشد. جمعیت کل پروتوزوآ نیز در دو تیمار دریافت کننده‌ی روی- متیونین و سلنومتیونین به تنهایی کاهش داشت (p =۰/۰۰۱). سایر زیر خانواده‌های ایزوتریشیدا، انتودینینه، دیپلودینینه و افریواسکولسینه (p=۰/۰۰۱) نیز در تیمارهای حاوی روی-متیونین و سلنومتیونین کاهش نشان دادند. پروتوزوآ به دلیل بلعیدن و هضم باکتری های شکمبه در متابولیسم نیتروژن نقش دارند، لذا کاهش درصدی از جمعیت پروتوزوآ سبب افزایش ۳۵ درصدی جریان پروتئین میکروبی به روده دام می‌گردد (Baah و همکاران ، ۲۰۰۷). بنابر این کاهش جمعیت پروتوزوآ سبب بهبود راندمان مصرف پروتئین خوراک می‌گردد.

جدول ۹: تاثیرسلنومتیونین و روی-متیونین بر جمعیت پروتوزوآیی($n\times10^5$ در میلی‌لیتر) مایع شکمبه برون‌تنی (*in vitro*).

پروتوزوآ	تیمار				سطح	
	شاهد	سلنومتیونین	روی-متیونین	روی-سلنیوم	SEM	معنی‌داری
زیرخانواده						
ایزوتریشیده	۰/۳۰۰^{a}	۰/۰۲۰^{b}	۰/۰۴۲^{b}	۰/۲۱۷^{a}	۰/۰۱۷	۰/۰۰۱
انتودینینه	۵/۳۳۰^{b}	۲/۲۵۱^{c}	۲/۱۰۰^{c}	۶/۴۱۶^{a}	۰/۱۸۲	۰/۰۰۱
دیپلودینینه	۰/۱۴۴^{a}	۰/۰۵۵^{b}	۰/۰۲۸^{b}	۰/۱۲۸^{a}	۰/۰۱۲	۰/۰۰۲
افریواسکولسینه	۰/۰۴۴^{a}	۰/۰۲۷^{ab}	۰/۰۰۰^{b}	۰/۰۶۷^{a}	۰/۰۰۷	۰/۰۱۷
کل پروتوزوآ	۵/۵۱۸^{b}	۲/۳۵۳^{c}	۲/۱۷۰^{c}	۶/۸۲۸^{a}	۰/۱۹۳	۰/۰۰۱

مقایسه دو روش برون‌تنی و درون‌تنی

مقایسه و بررسی ارتباط بین دو روش(جداول ۱۰ و ۱۱)، نشان داد که تنها انرژی قابل سوخت و ساز، غلظت کل اسیدهای چرب زنجیر کوتاه کل و نرخ ثابت تولید گاز در دو روش یکسان بود. در ضمن به غیر از پروتئین میکروبی و نیتروژن آمونیاکی، مقادیر همه فراسنجه‌ها در روش درون‌تنی بیش از روش برون‌تنی بود. لذا به نظر می‌رسد نتایج روش برون تنی را نتوان برای دام زنده تعمیم داد، گرچه این موضوع نیازمند تحقیقات بیشتری است.

جدول ۱۰ : مقایسه نتایج کینتیک تخمیر در دو روش برون‌تنی و درون تنی.

فراسنجه	تیمار											
	شاهد			سلنومتیونین			روی-متیونین			روی-سلنیوم		
	برون‌تنی	درون‌تنی	P Value	برون-تنی	درون-تنی	P Value	برون-تنی	درون‌تنی	P Value	برون‌تنی	درون‌تنی	P Value
b	۳۳/۲۱^{b}	۴۵/۵۵^{a}	۰/۰۰۱	۳۵/۸۶^{b}	۲۳/۹۴^{a}	۰/۰۳۷	۳۲/۸۹^{b}	۴۳/۹۳^{a}	۰/۰۳۴	۳۲/۷۱^{b}	۴۷/۵۶^{a}	۰/۰۰۱
c/h	۰/۰۳۹۶	۰/۰۴۴۴	۰/۰۶۵	۰/۰۳۹۸	۰/۰۴۱۹	۰/۶۹۱	۰/۰۵۰۷	۰/۰۴۱۵	۰/۵۵۶	۰/۰۳۸۸^{b}	۰/۰۴۶۵^{a}	۰/۰۳۹
تولید گاز ۲۴ ساعت (میلی لیتر)	۱۸/۸۹^{b}	۳۷/۹۸^{a}	۰/۰۰۱	۱۹/۹۰^{b}	۲۹/۷۰^{a}	۰/۰۰۱	۲۰/۴۵^{b}	۲۶/۸۴^{a}	۰/۰۰۱	۱۶/۷۹^{b}	۳۳/۲۸^{a}	۰/۰۰۱
تولید گاز ۹۶ ساعت (میلی لیتر)	۲۸/۶۸^{b}	۵۱/۷۱^{a}	۰/۰۰۱	۳۲/۷۲^{b}	۴۴/۳۸^{a}	۰/۰۰۱	۳۳/۱۰^{b}	۴۳/۳۰^{a}	۰/۰۰۱	۲۶/۸۴^{b}	۴۸/۴۲^{a}	۰/۰۰۱

b = پتانسیل تولید گاز ،c= نرخ ثابت تولید گاز

جدول ۱۱ : مقایسه نتایج فراسنجه‌های تخمیر در دو روش برون‌تنی و درون تنی.

فراسنجه	تیمار											
	شاهد			سلنومتیونین			روی-متیونین			روی-سلنیوم		
	برون‌تنی	درون-تنی	p-Value	برون‌تنی	درون-تنی	p-Value	برون‌تنی	درون تنی	p-Value	برون‌تنی	درون-تنی	p-Value
انرژی قابل سوخت و ساز (مگاژول/)	۶/۸۴	۷/۳۸	۰/۵۴۳	۷/۸۶	۶/۳۱	۰/۲۲۲	۷/۳۹^{a}	۵/۹۳^{b}	۰/۰۰۹	۷/۱۰	۶/۹۷	۰/۶۸۶
قابلیت هضم ماده آلی (درصد)	۲۹/۹۲^{b}	۴۸/۳۲^{a}	۰/۰۰۱	۳۲/۶۲^{b}	۴۱/۲۹^{a}	۰/۰۰۱	۳۱/۵۹^{b}	۳۹/۱۹^{a}	۰/۰۱۲	۲۹/۸۷^{b}	۴۴/۴۷^{a}	۰/۰۰۱
ماده آلی هضم شده(میلی گرم/ ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)	۵۹/۸۵^{b}	۹۴/۸۷^{a}	۰/۰۰۱	۶۵/۲۶^{b}	۸۴/۱۱^{a}	۰/۰۰۱	۶۳/۱۹^{b}	۷۸/۲۳^{a}	۰/۰۰۱	۵۹/۷۳^{b}	۸۸/۲۷^{a}	۰/۰۰۱
نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم/ لیتر)	۲۳۳/۹۶^{a}	۸۴/۲۷^{b}	۰/۰۰۱	۲۲۸/۳۶^{a}	۸۸/۷۲^{b}	۰/۰۰۱	۲۵۷/۸۷^{a}	۹۴/۸۹^{b}	۰/۰۰۱	۱۱۹/۵۷^{a}	۷۲/۵۵^{b}	۰/۰۰۱
ضریب تفکیک پذیری (میلی گرم/ میلی‌لیتر)	۳/۷۸^{a}	۲/۵۹^{b}	۰/۰۳۹	۳/۳۶	۲/۷۹	۰/۰۹۴	۳/۴۶	۲/۸۷	۰/۰۵۷	۳/۷۸^{a}	۲/۶۷^{b}	۰/۰۲۱
پروتئین میکروبی (میلی گرم/ گرم ماده خشک)	۲۲/۷۶^{a}	۱۴/۰۲^{b}	۰/۰۰۱	۲۱/۴۸^{a}	۱۷/۳۶^{b}	۰/۰۰۱	۲۱/۹۶^{a}	۱۸/۳۵^{b}	۰/۰۱۲	۲۲/۶۷^{a}	۱۵/۸۵^{b}	۰/۰۰۱
کل اسیدهای چرب کوتاه زنجیر *	۴۵/۰۰	۳۷/۰۰	۰/۴۰۰	۵۷/۶۰	۴۵/۰۰	۰/۴۱۵	۶۱/۲۰^{a}	۳۸/۰۰^{b}	۰/۰۱۲	۵۱/۶۰	۴۵/۸۰	۰/۶۶۶
**	۳۸/۶^{b}	۸۲/۹^{a}	۰/۰۰۱	۴۳/۷^{b}	۶۵/۶^{a}	۰/۰۰۱	۴۱/۲^{b}	۶۰/۰^{a}	۰/۱۶۶	۳۶/۸^{b}	۷۳/۲^{a}	۰/۰۰۱

*روش بارنت و رید ۱۹۵۷(میلی مول/ لیتر)، ** معادله گتچو ۲۰۰۲(میلی مول /لیتر)

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از ۴۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم روی-متیونین و سلنومتیونین (به ترتیب حاوی ۴۰ و ۰/۳ میلی‌گرم روی و سلنیوم در کیلوگرم ماده خشک) در جیره گوسفندان به میزان بیش از توصیه NRC (۲۰۰۷) تاثیر مثبتی بر تخمیر شکمبه نداشت؛ بنابراین استفاده در این سطح پیشنهاد نمی‌گردد. به هر حال، سطوح مذکور رشد و تکثیر پروتوزوآ را به طرز قابل توجهی افزایش داد. به استثنای کل اسیدهای چرب زنجیر کوتاه و انرژی قابل سوخت و ساز، نتایج فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در روش‌برون‌تنی کاملاً متفاوت از روش درون‌تنی بود. بنابراین نتایج حاصل از آزمایش‌های برون-تنی را نباید با اطمینان برای دام های زنده تعمیم داد.

منابع

کاظمی، سعیده (۱۳۹۴). بررسی تأثیر منابع آلی و معدنی روی بر ارزش تغذیه‌ای لاشه و صفات اقتصادی گوسفندان نژاد سنجابی. پایان نامه دکتری حرفه ای. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی.

علیمحمدی، رضا (۱۳۹۱). اثر سطوح و منابع مختلف سلنیوم بر عملکرد و فراسنجه‌های شکمبه و پلاسمای بره های نر مهربان. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه بوعلی سینا. ۱۰۷ص.

AOAC. (1990). Official methods of analysis, Vol. I. 15th ed. Arlington, VA.

Arelovich, H., Owens, F., Horn, G. and Vizcarra, J.(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.

Bach, A., Calsamiglia, S. and Stern, M.(2005). Nitrogenmetabolism in the rumen. *Journal of dairy science*. 88: E9-E21.

Baah,J., Ivan,M., Hristov ,A.N., Koenig ,K.M., Rode,L.M. and McAlliste,T.A. (2007).Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers.*Animal Feed Science and Technology* .137: 126–137.

Barnett, A. and Reid, R.(1957). Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen. 1. The volatile acid production from fresh grass. *Journal of Agricultural Science*.48: 315-321.

Bateman, H., Williams, C., Gantt, D., Chung, Y., Beem, A., Stanley, C., Goodier, G., Hoyt, P., Ward, J. and Bunting, L.(2004). Effects of zinc and sodium monensin on ruminal degradation of lysine-HCl and liquid 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid. *Journal of dairy science*. 87: 2571-2577.

Bonhomme, A., Durand, M., Dumay, C. and Beaumatin, P.(1979). Etude *in vitro* du comportement des populations microbiennes du rumen en présence de zinc sous forme de sulfate. In: *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 937-942.

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

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

Ellis, J., Kebreab, E., Odongo, N., McBride, B., Okine, E. and France, J.(2007). Prediction of methane production from dairy and beef cattle.*Journal of dairy science*. 90:3456-3466.

Eryavuz, A. and 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: 175-183.

Faixova, Z., Faix, Š., Leng, Ľ., Vaczi, P., Makova, Z. and Szaboova, R.(2007). Haematological, blood and rumen chemistry changes in lambs following supplementation with Se-yeast. *Acta Veterinaria Brno.* 76: 3-8.

Lopez, S., Dhanoa, M., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E. and France, J.(2007). Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*. 135: 139-156.

Martinez, A. and Church, D.(1970).Effect of Various Mineral Elements on Rumen Cellulose Digestion. *Journal of animal science*. 31: 982-990.

McDonald, P., Edwards, R A., Greenhalgh, J. F.D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. and Wilkinson, R.G .(2010). Animal Nutrition, 7 th Edition. Prentice Hall/Pearson.

McIntosh, F., Williams, P., Losa, R., Wallace, R., Beever, D. and Newbold, C.(2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and environmental microbiology*. 69: 5011-5014.

Menke, K., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W.(1979). The estimation of the digestibility andmetabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*.93: 217-222.

Menke, K.H. and Steingass, H.(1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid.*Animal Research Development*. 28:7-55.

Mihaliková, K., Boldižárová, K., Faix, Š. and Kišidayová, S.(2005).The effects of organic selenium supplementation on the rumen ciliate population in sheep. *Folia microbiologica*. 50: 353-356.

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

National Research Council. (2007). Nutrient Requirments of Small Ruminants. National academy Press, Washington, DC.,USA.

Froetschel, M., Martin, A., Amos, H. and Evans, J.(1990).Effects of zinc sulfate concentration and feeding frequency on ruminal protozoal numbers, fermentation patterns and amino acid passage in steers. *Journal of animal science*. 68: 2874-2884.

Garg, A.K, Vishal,M. and Dass, R.S. (2008). Effect of organic zinc supplementation on growth, nutrient utilization and mineral profile in lambs. *Animal feed science and technology*.144: 82-96.

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

Guyot, H., Spring, P. and Andrieu, S.(2007). Comparative responses to sodium selenite and organic selenium supplements in Belgian Blue cows and calves. *Livestok Science*. 111: 259–263.

Hussain, I. and Cheeke, P.(1995). Effect ofdietary Yucca schidigera extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*. 51:231-242.

Jia,W., Zhu,X., Zhang,W., Cheng,J.,Guo, Cand. and Jia, Z .(2009). Effects of Source of Supplemental Zinc on Performance, Nutrient Digestibility and Plasma Mineral Profile in Cashmere Goats. *Asian-Aust Journal Animal Science*. Vol. 22(12): 1648 – 1653.

Jouany,J.P and Ushida , K.(1999). The role of protozoa in feed Digestion Review .*Asian osralian Jornal of animal Scienc*. 12(1):113-128.

Juszczuk-Kubiak, E., Bujko,K., Cymer, M., Wicińska,K., Gabryszuk, M and Pierzchała, M.(2016). Effect of inorganic dietary selenium supplementationon selenoprotein and lipid metabolism gene expression patterns in liver and loin muscle of growing lambs. *Biological Trace Element Research.* 172:336–345.

SPSS (2012) SPSS version 21.0 for Microsoft Windows platform. SPSS Inc.: Chicago, IL, USA.

Sobhanirad, Sand , Naserian, A.A .(2012). Effects of high dietary zinc concentration and zinc sources on hematology and biochemistry of blood serum in Holstein dairy cows.*Animal Feed Science and Technology*.177: 242– 246.

Surai, P.(2002). Antioxidant protection in the intestine: a good beginning is half the battle. In: Proc. Alltech's 18th. *Annual Symposium Biotechnology in the Feed Industry*. Nottingham University Press, Nottingham (UK), pp. 302-321.

Vercoe, P.E., Makkar, H.P. and Schlink, A.C.(2010).*In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Nuclear and Related Methodologies.* Springer.

Wang, C., Liu, Q., Yang, W., Dong, Q., Yang, X., He, D., Zhang, P., Dong, K. and Huang, Y.(2009).Effects of selenium yeast on rumen fermentation, lactation performance and feed digestibilities in lactating dairy cows. *Livestock Science*. 126: 239-244.

Wright, P. L. and Bell, M. C. (1966). Comparative metabolism of seleniumand tellurium in sheep and swine. *American Journal Physiology*. 211: 6–10.

Xun, W., Shi, L., Yue, W., Zhang, C., Ren, Y. and Liu, Q.(2012). Effect of High-Dose Nano-selenium and Selenium–Yeast on Feed Digestibility ,Rumen Fermentation, and Purine Derivatives in Sheep. *Biological trace element research.*150: 130-136.

Naziroğlu, M. and Aksakal, M.(1997). Effects of vitamin E and selenium on rumen protozoa in lambs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.* 21: 81-90.

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

Puchala, R., Sahlu, T. and Davis, J.(1999). Effects of zinc-methionine on performance of Angora goats. *Small Ruminant Research*. 33: 1-8.

Russell, J., Strobel, H. and Chen, G.(1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied and Environmental Microbiology.*54: 872-877.

Satter, L. D. and Slyter, L. L. (1974).Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*.*British Jornal of Nutrition*. 32: 199-208.

Shi, L., Xun, W., Yue, W., Zhang, C., Ren, Y., Liu, Q., Wang, Q. and Shi, L.(2011). Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 163:136-142.

Spears, J.W., Schlegel, P., Seal, M.C and Lloy, K.E .(2004). Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organiczinc sources and their effects on ruminal volatilefatty acid proportions .*Livestock Production Science*. 90: 211– 217