

بررسی تأثیر عصاره گیاه تشنه‌داری (*Scrophularia striata* Boiss) بر فراسنجه‌های تولید گاز آزمایشگاهی، غلظت اسیدهای چرب فرار و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک محتویات سکوم خرگوش نر بالغ

زهره شمسی بیرانوندی^۱، علی کیانی^۲، افرا خسروی^۳ و ایوب عزیزی^۴

۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، (نویسنده مسؤل: biranandi2019@gmail.com)

۲ و ۴- دانشیار و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۳- استاد گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی، دانشگاه ایلام

تاریخ دریافت: ۹۹/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۲۲

صفحه: ۶۸ تا ۷۴

چکیده

در این پژوهش تأثیر سطوح مختلف عصاره گیاه تشنه‌داری بر فراسنجه‌های تولید گاز آزمایشگاهی، غلظت اسیدهای چرب فرار و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک محتویات سکوم خرگوش‌های نر بالغ بررسی شد. برای همین منظور از تعداد ۲۰ سر خرگوش نژاد نیوزلندی با وزن تقریبی $1/6 \pm 0/2$ کیلوگرم (۵ ماهه به بالا)، در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و پنج تکرار استفاده شد. تیمارها شامل (۱) بدون دریافت عصاره تشنه‌داری (شاهد)، و (سطوح ۲) ۲۰۰، (۳) ۳۰۰ و (۴) ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه تشنه‌داری به ازای کیلوگرم وزن زنده بدن تقسیم شدند. گروه شاهد به جای عصاره مقدار دو میلی لیتر آب دریافت کرد. در انتهای دوره آزمایش و پس از کشتار خرگوش‌ها، از محتویات سکوم آن‌ها نمونه برداری شده و فراسنجه‌های تولید گاز، غلظت اسیدهای چرب فرار و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک نمونه سکوم تعیین شد. نتایج نشان داد که مصرف عصاره تشنه‌داری حجم گاز تولیدی ($p < 0/05$) و میزان کل اسیدهای چرب فرار را کاهش داد ($p = 0/01$). مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز ($p = 0/02$) و میکروکریستالین سلولاز ($p = 0/01$) را به صورت خطی افزایش داد، ولی بر فعالیت کربوکسی‌متیل سلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی تأثیر معنی‌داری نداشت. در کل عصاره گیاه تشنه‌داری توانسته فعالیت‌های میکروبی و آنزیمی روده بزرگ خرگوش را تحت تأثیر قرار دهد، به طوری که فعالیت‌های میکروبی با مصرف این گیاه کاهش یافته و نهایتاً منجر به تولید کمتر گاز و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار شده است.

واژه‌های کلیدی: تولید گاز، خرگوش، عصاره گیاه تشنه‌داری، فعالیت آنزیمی سکوم

مقدمه

گیاه تشنه‌داری سازویی^۱ با نام محلی تشنه‌داری یک گیاه علفی بوته‌ای با برگ‌های متناوب متقابل بدون گوشوارک، گل‌های پنج پرزیگومورف، میوه کپسولی از تیره گل میمونی است که بیشتر در مناطق سردسیر کوهستانی زاگرس رشد می‌کند (۴،۲). عصاره گیاه تشنه‌داری داری سه فلاونوئید به نام‌های کوئرستین^۲، فنیل پروپانویید گلوکوزید و ایزورهمنتین^۳-۱-روتینوزید و نیپترین^۴ بوده و همچنین دارای لینالول است (۱۶). گزارش‌هایی وجود دارند که نشان می‌دهند فلاونول (۱۶)، کوئرستین (مهم‌ترین فلاونوئید موجود در گیاه تشنه‌داری) باعث تغییراتی در جمعیت میکروبی دستگاه گوارش حیوانات شده است (۱۶،۸). فلاونوئیدها به طور مستقیم و یا از راه تولید مشتقات جدید با عمل تخریب، فعالیت میکروبی شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۸). متابولیت‌های ثانویه و ساختار فنولیک آن‌ها منجر به پاره شدن غشاء یاخته، غیر فعال شدن آنزیم‌ها و کاهش یون‌های فلزی و بستری لازم برای سوخت و ساز یاخته می‌شود (۱۴،۱).

مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری باعث افزایش گوارش‌پذیری الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی در گوسفند شده است (۱۴). محققین نشان داده‌اند که افزودن اسانس مرو تلخ (از لحاظ لینالول با عصاره تشنه‌داری مشابهت دارد) به جیره نشخوارکنندگان موجب کاهش پتانسیل تولید گاز، تجزیه‌پذیری ماده آلی و پروتئین میکروبی

شده است (۱۷). البته برخی از مطالعات اثرات ضد میکروبی عصاره گیاه تشنه‌داری را روی فعالیت باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) و گرم منفی (*اشرشیا کلائی*) نشان داده‌اند (۱۴،۳).

اطلاعات درباره تأثیر گیاه تشنه‌داری بر خصوصیات تخمیر سکومی در علف‌خواران مانند اسب و خرگوش که دارای تخمیر پس معده‌ای یا سکومی هستند، بسیار نادر است. ممکن است گیاه تشنه‌داری به علت داشتن ترکیبات ضد میکروبی مانند لینالول و فلاونوئیدها باعث محدود شدن فعالیت‌های میکروارگانیسمی در روده فراخ شود. در این تحقیق تأثیر عصاره گیاه تشنه‌داری بر تولید گاز آزمایشگاهی، غلظت اسیدهای چرب فرار، جمعیت پروتوزایی و فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی محتویات سکوم خرگوش‌های نر بالغ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

بوته گیاه تشنه‌داری از دامنه کوه‌های زاگرس در ایلام در فصل بهار جمع‌آوری شد. اندام‌های هوایی گیاه ابتدا توسط آب شسته شد و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد هوا خشک و با آسیاب مکانیکی آسیاب شد. به طور خلاصه، ۴ گرم از گیاه تشنه‌داری به صورت پودر شده به داخل ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری قهوه‌ای رنگ ریخته شد و پس از افزودن ۸۰ میلی لیتر محلول عصاره‌گیری (۸۰ درصد متانول، ۱۹/۵ درصد آب مقطر ۰/۵ درصد اسید استیک)، آن‌ها کاملاً مخلوط شدند.

1- *Scrophularia striata*

2- Quercetine

3- Isorhamnetin-3-o-rutinoside and nepitrin

4- MISONIX XL-2000 sonicator

ویال‌های آزمایشی، محتویات سکومی توسط چهار لایه پارچه پنبه صاف شد. برای این منظور میزان ۲۵۰ میلی‌گرم نمونه از جیره‌های آزمایشی با اندازه ذرات یک میلی‌متر که حاوی سطوح مختلف عصاره گیاه تشنه‌داری بودند، به‌داخل ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری برای تعیین پارامترهای آزمون تولید گاز قرار داده شد. باید بیان نمود که جیره‌های آزمایشی آنکوبه شده در شرایط برون‌تنی همان جیره‌های تغذیه شده به خرگوش‌ها در دوره اصلی آزمایش بود. سپس، هر ویال که از قبل دمای آن با قرار دادن در بن‌ماری به ۳۹ درجه‌سانتی‌گراد رسیده بود، با ۵ میلی‌لیتر مایع سکومی صاف شده و ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی تلقیح شد (۱۲، ۱۵). جهت حصول اطمینان از شرایط بی‌هوایی، گاز دی‌اکسید کربن به مایع سکومی و بزاق مصنوعی قبل و بعد از تزریق به‌داخل ویال‌ها نیز تزریق گردید. میزان سه ویال نیز به‌عنوان بلانک (حاوی فقط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. سپس درب ویال‌ها بسته شد و در بن‌ماری با دمای حدود ۳۹ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شدند.

میزان گاز تولیدی در ویال‌ها (۵ تکرار در هر تیمار) توسط دستگاه فشارسنج در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از آنکوباسیون اندازه‌گیری شد. برای تعیین پارامترهای تولید گاز از رابطه $P = b(1 - e^{-ct})$ استفاده گردید (۸، ۱۰). در این رابطه b گاز تولیدی از بخش تخمیرپذیر (میلی‌لیتر)، c نرخ تولید گاز در ساعت، t زمان آنکوباسیون بر حسب ساعت و P میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد. سپس محتویات هر ویال با ۲۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بقایای هر ویال جمع‌آوری و خشک گردید. میزان گوارش پذیری ماده خشک از اختلاف وزن سوبسترای اولیه و وزن بقایا پس از آنکوباسیون محاسبه شد.

تعیین اسیدهای چرب فرار در مایع سکومی

اسیدهای چرب فرار نمونه‌های سکومی خرگوش‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Milan, Italy Fisons Instruments, HRGC mega 2,) اندازه‌گیری شد. برنامه دمایی و دیگر مشخصات دستگاه به‌صورت زیر بود؛ ۱: دمای تزریق کننده و تشخیص‌دهنده ۲: دستگاه به‌ترتیب ۱۱۰ و ۲۰۰ درجه سلسیوس بود. گاز ناقل در این دستگاه هلیوم و تشخیص‌دهنده آن از نوع FID 3 بود. دمای ستون دستگاه در آغاز ۱۱۰ درجه سلسیوس بود که به‌مدت دو دقیقه در این دما نگه داشته شد و آنگاه در طول پنج دقیقه به ۲۰۰ درجه سلسیوس رسانده شد و برای یک دقیقه در این دما باقی ماند. ایزوکاپروئیک اسید به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. استفاده از رابطه زیر میزان کل اسیدهای چرب فرار محاسبه شد:

$10 \times \text{عدد تیتراسیون} = \text{میلی‌مول اسید در لیتر مایع شکمبه}$

سپس، ویال‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در معرض امواج دستگاه اولتراسونیک^۱ قرار گرفتند. سوسپانسیون حاصله به‌داخل لوله‌های فالدکون ریخته شده و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول شفاف رویی به‌داخل لوله‌های قهوه‌ای ریخته شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد (۱۶).

جیره‌های آزمایشی خرگوش‌ها

برای انجام آزمایش تعداد ۲۰ سر خرگوش نژاد نیوزلندی با وزن تقریبی $1/6 \pm 0/2$ کیلوگرم (۵ ماهه به بالا)، از مؤسسه رازی کرج تهیه شد. خرگوش‌ها در طول دوره آزمایش در اتاق نگهداری حیوانات دانشگاه ایلام قرار داده شدند. به‌منظور عادت‌پذیری با شرایط محیطی جدید، خرگوش‌ها به‌مدت دو هفته در دما، رطوبت و نور مناسب (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) در اتاق حیوانات نگهداری شدند. آزمایش اصلی به‌مدت چهار هفته انجام شد. در طول دوره عادت‌پذیری و اصلی آزمایش، خرگوش‌ها با یک جیره پایه ویژه احتیاجات غذایی خرگوش با استفاده از خوراک تهیه شده از شرکت خوراک دام به‌پهور تغذیه شدند. ترکیب شیمیایی جیره مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است. حیوانات در طول آزمایش به آب و غذای کافی دسترسی داشتند.

خرگوش‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه پنج تایی (پنج تکرار شامل ۱) بدون دریافت عصاره تشنه‌داری (شاهد)، و مکمل کردن جیره شاهد با سطوح ۲ (۳، ۲۰۰) و ۳ (۳، ۳۰۰) و ۴ (۴، ۴۰۰) میلی‌گرم عصاره گیاه تشنه‌داری به ازای کیلوگرم وزن زنده بدن تقسیم شدند. خرگوش‌ها عصاره مورد نظر را در حجم دو میلی‌لیتر به‌صورت روزانه از طریق گاواژ دهانی قبل از غذا دریافت کردند. در گروه شاهد به‌جای عصاره از دو میلی‌لیتر آب استفاده شد. پس از اتمام دوره آزمایش به‌مدت چهار هفته، خرگوش‌ها کشتار شدند و از محتویات سکوم آن‌ها نمونه برداری به‌عمل آمد. ابتدا pH محتویات سکوم ثبت شد. مقدار پنج گرم محتویات سکوم در هر خرگوش برای انجام آزمون تولید گاز آزمایشگاهی در شرایط برون‌تنی در نظر گرفته شد. نمونه‌های مذکور در یک فلاسک عایق که از قبل توسط گاز دی‌اکسید کربن بی‌هوایی شده بود، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد سریعاً (در کمتر از نیم ساعت) به آزمایشگاه منتقل شدند. مقدار دو گرم دیگر از محتویات سکومی به‌منظور اندازه‌گیری غلظت اسیدهای چرب فرار جمع‌آوری شد و تا موقع آنالیز در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. یک نمونه دو گرمی دیگر به‌منظور تعیین فعالیت آنزیم‌های میکروبی سکوم شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی و آلفا آمیلاز از محتویات سکومی تهیه شد.

آزمون تولید گاز آزمایشگاهی

از محتویات سکوم خرگوش‌ها به‌عنوان ماده تلقیحی برای انجام آزمون تولید گاز استفاده شد. قبل از تزریق به داخل

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی جیره پایه تغذیه شده به خرگوش‌های بالغ نر

Table 1. Chemical compounds of basic rations fed to adult male rabbits

ترکیبات شیمیایی	
۹۰±/۵۰	ماده خشک
۱۴±/۵	انرژی قابل هضم (مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک)
۱۵/۵±۰/۵۰	پروتئین خام
۴±۰/۲۰	چربی خام
۱۳±۰/۳۰	فیبر خام
۱۰±۰/۳۰	خاکستر خام
۱±۰/۰۲	کلسیم
۰/۷±۰/۱۰	فسفر
۰/۵±۰/۰۵	نمک
۰/۳۷	لازین
۰/۲۹	متیونین
۰/۵۵	متیونین+سیستین
۰/۶۴	ترئونین
۰/۲۲	تریپتوفان

نتایج و بحث

تأثیر مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری بر حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ پس از انکوباسیون، حجم گاز تولیدی از بخش نامحلول اما قابل تخمیر خوراک (b)، ثابت نرخ تولید گاز برای بخش b (c) و قابلیت هضم ماده خشک در شرایط برون‌تنی در جدول ۲ آمده است. حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۴۸ ($P=۰/۰۱$) و ۹۶ ($P=۰/۰۳$) ساعت انکوباسیون در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره گیاه تشنه‌داری در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت. همچنین، حجم تولید گاز از بخش نامحلول قابل تخمیر (b) در گروه‌های مصرف‌کننده عصاره نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت ($P=۰/۰۱$)، و با افزایش دوز مصرفی عصاره، میزان کاهش بیشتر بود. بیشترین میزان ثابت نرخ تولید گاز (c) مربوط به دوز مصرفی ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بود که با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($P=۰/۰۱$). حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون و قابلیت هضم ماده خشک تحت تأثیر عصاره گیاه تشنه‌داری قرار نگرفت.

نتایج حاصل از اثر عصاره گیاه تشنه‌داری بر وزن بدن و فراسنجه‌های آنزیمی در جدول ۳ و ۴ گزارش شده است. مصرف عصاره در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم تأثیری بر وزن نهایی خرگوش‌ها نداشت، اما سطح ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم باعث کاهش وزن آن‌ها نسبت به گروه شاهد شد ($p=۰/۰۳$). بیشترین pH محتویات سکومی مربوط به سطح ۳۰۰ میلی‌گرم و کمترین آن مربوط به سطح ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه تشنه‌داری بود. مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ($p=۰/۰۲$) و میکروکریستالین سلولاز ($p=۰/۰۱$) داشت. از نظر فعالیت تجزیه کاغذ صافی و کربوکسی متیل سلولاز تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد.

تأثیر مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری بر غلظت اسیدهای چرب فرار محتویات سکوم خرگوش‌ها در جدول ۵ گزارش شده است. استفاده از عصاره گیاه تشنه‌داری میزان کل اسیدهای چرب فرار، اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک، اسید ایزو-والریک و اسید ان-والریک را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش داد ($p=۰/۰۱$).

تعیین فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی و آلفا آمیلاز در نمونه‌های سکومی به‌روش Agarwal (۲۰۰۰) برآورد شد (۳). برای تخمین فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر شیرابه شکمه و ۰/۵ میلی‌لیتر کربوکسی متیل سلولاز ۱ درصد (به‌عنوان سوبسترا) بود که در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. مخلوط واکنش برای آنزیم میکروکریستالین سلولاز که شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر محتویات سکوم و ۱ میلی‌لیتر میکروکریستالین سلولاز ۱ درصد (به‌عنوان سوبسترا) بود در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت. به‌منظور محاسبه فعالیت کاغذ صافی، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر محتویات سکوم و ۰/۵ گرم کاغذ صافی واکنش شماره ۱ (به‌عنوان سوبسترا)، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آلفا آمیلاز، مخلوط واکنش محتوی ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر محتویات سکوم و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر محتویات سکوم و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نشاسته ۱ درصد (به‌عنوان سوبسترا) در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. در همه آزمون‌های مذکور، واکنش با افزودن ۳ میلی‌لیتر محلول دی‌نیتروسالیسیلیک اسید متوقف شد. پس از استخراج آنزیم‌های مذکور، فعالیت آنزیم‌های مذکور توسط دستگاه اسپکتروفتومتری تخمین زده شد.

آنالیز آماری

داده‌های آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM آنالیز آماری شدند. مقایسات مستقل به‌صورت خطی و درجه دوم با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی انجام شد.

جدول ۲- تأثیر مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری بر حجم گاز تولیدی در زمان‌های مختلف انکوباسیون و قابلیت هضم ماده خشک در خرگوش‌های نر بالغ در شرایط برون تنی

Table 2. The effect of *Scrophularia striata* Boiss extract consumption on the volume of gas produced at different incubation times and dry matter digestibility in adult male rabbits in *in vitro* conditions

مقیاسات		خطای استاندارد میانگین	عصاره گیاه تشنه‌داری ^۱				حجم گاز تولیدی (میلی لیتر / ساعت)
درجه دو	خطی		۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰	شاهد	
۰/۸۸	۰/۰۷	۲/۰۱	۴۱/۹	۴۵/۴	۴۳/۸	۴۷/۹	۲۴
۰/۸۱	۰/۰۱	۲/۶۳	۴۲/۹ ^c	۵۳/۹ ^{ab}	۴۹/۴ ^{bc}	۵۹/۱ ^a	۴۸
۰/۴۴	۰/۱۱	۳/۶۷	۵۱/۹	۵۴/۶	۵۳/۲	۶۰/۹	۷۲
۰/۸۴	۰/۰۳	۳/۰۸	۵۱/۵ ^c	۶۴/۰ ^{ab}	۵۴/۸ ^{bc}	۶۶/۳ ^a	۹۶
۰/۵۴	۰/۰۵	۳/۰۵	۵۰/۳ ^b	۶۳/۵ ^a	۵۴/۱ ^{ab}	۶۳/۵ ^a	تولید گاز از بخش نامحلول قابل تخمیر (b)
۰/۰۹	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۷ ^a	۰/۰۵ ^d	۰/۰۷ ^a	۰/۰۵ ^d	ثابت نرخ تولید گاز (c)
۰/۵۹	۰/۸۸	۳/۱۳	۳۸/۹	۳۴/۳	۳۷/۸	۳۶/۹	قابلیت هضم ماده خشک (درصد)

۱- شاهد: جیره‌ی بدون عصاره؛ ۲۰۰: جیره‌ی شاهد + ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره؛ ۳۰۰: جیره‌ی شاهد + ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره؛ ۴۰۰: جیره‌ی شاهد + ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره به ازای هر کیلوگرم وزن بدن
حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۳- تأثیر مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری بر وزن بدن خرگوش‌های نر بالغ

Table 3. The effect of *Scrophularia striata* Boiss extract consumption on body weight of adult male rabbits

سطح معنی‌داری		خطای استاندارد میانگین	عصاره گیاه تشنه‌داری				وزن بدن
درجه دو	خطی		۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۰	
۰/۰۵	۰/۹۱	۳/۲۴	۲۰۱۳ ^{bc}	۲۰۱۶ ^b	۲۰۳۳ ^a	۲۰۰۸ ^c	وزن اولیه بدن (گرم)
۰/۰۱	۰/۰۳	۲۳/۵	۲۳۶۷ ^a	۲۶۶۰ ^a	۲۶۱۸ ^c	۲۶۴۲ ^d	وزن نهایی بدن (گرم)

شاهد: جیره‌ی بدون عصاره تشنه‌داری؛ ۲۰۰: جیره‌ی شاهد + ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره تشنه‌داری؛ ۳۰۰: جیره‌ی شاهد + ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره تشنه‌داری؛ ۴۰۰: جیره‌ی شاهد + ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره تشنه‌داری.
حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۴- تأثیر مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری بر فعالیت آنزیمی محتویات سکومی خرگوش‌های نر بالغ

Table 4. The effect of *Scrophularia striata* Boiss extract consumption on enzymatic activity of cecal contents of adult male rabbits

سطح معنی‌داری		خطای استاندارد میانگین	عصاره گیاه تشنه‌داری				فعالیت آنزیمی محتویات سکومی
درجه دو	خطی		۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۰	
۰/۹۶	۰/۴۹	۸/۷۱	۱۴۶	۱۴۹	۱۴۲	۱۵۱	کربوکسی متیل سلولاز (واحد/دقیقه/مایع شکمبه)
۰/۹۰	۰/۰۲	۱/۶۹	۴۷/۷ ^a	۴۴/۹ ^{ab}	۴۲/۱ ^{ab}	۳۹/۷ ^d	آمیلاز (واحد/دقیقه/مایع شکمبه)
۰/۷۹	۰/۲۳	۲/۵۷	۴۹/۴	۴۶/۳	۴۸/۰	۴۹/۵	فعالیت تجزیه کاغذ صافی (واحد/دقیقه/مایع شکمبه)
۰/۰۶	۰/۰۱	۱/۵۴	۴۷/۰ ^a	۳۷/۱ ^d	۳۴/۹ ^{bc}	۳۲/۶ ^c	میکروکریستالین سلولاز (واحد/دقیقه/مایع شکمبه)
۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۰۳	۶/۵ ^c	۶/۹ ^a	۶/۶ ^{bc}	۶/۷ ^d	pH

شاهد: جیره‌ی بدون عصاره تشنه‌داری؛ ۲۰۰: جیره‌ی شاهد + ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره تشنه‌داری؛ ۳۰۰: جیره‌ی شاهد + ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره تشنه‌داری؛ ۴۰۰: جیره‌ی شاهد + ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره تشنه‌داری.
حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۵- تأثیر مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری بر غلظت اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول در میلی‌لیتر) محتویات سکومی خرگوش‌های نر بالغ

Table 5. The effect of *Scrophularia striata* Boiss extract consumption on the concentration of volatile fatty acids (mmol / ml) Cecal contents of adult male rabbits

سطح معنی‌داری		خطای استاندارد میانگین	عصاره گیاه تشنه‌داری				غلظت اسیدهای چرب فرار (میلی مول در میلی لیتر)
درجه دو	خطی		۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰	شاهد	
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۹۵۵	۱۴۸ ^c	۱۴۴ ^d	۱۷۹ ^d	۲۵۳ ^a	کل اسیدهای چرب فرار
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۶۶۷	۸۱/۲ ^d	۶۹/۸ ^c	۶۵/۶ ^c	۱۱۳/۷ ^a	اسید استیک
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۴۰۰	۱۳/۸ ^d	۱۲/۷ ^d	۷/۸ ^c	۲۷/۸ ^a	اسید پروپیونیک
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۴۵۳	۳۶/۴ ^c	۴۶/۹ ^d	۳۲/۰ ^d	۸۳/۳ ^a	اسید بوتیریک
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۵۰	۱/۳ ^{bc}	۱/۳ ^c	۱/۳ ^c	۲/۸ ^a	اسید ایزو-والریک
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۱۶۹	۱۵/۱ ^d	۱۳/۴ ^c	۱۳/۶ ^c	۲۴/۴ ^a	اسید ان-والریک

شاهد: جیره‌ی بدون عصاره تشنه‌داری؛ ۲۰۰: جیره‌ی شاهد + ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره تشنه‌داری؛ ۳۰۰: جیره‌ی شاهد + ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره تشنه‌داری؛ ۴۰۰: جیره‌ی شاهد + ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره تشنه‌داری.
حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

کلونیزاسیون میکروبی در نظر گرفته می‌شوند (۱۳). می‌توان با مقایسه فعالیت آنزیمی بین تیمارهای مختلف، به‌طور غیر مستقیم جمعیت میکروبی روده بزرگ را نیز مقایسه نمود، زیرا فعالیت میکروبی به‌طور غیر مستقیم شاخصی از رشد میکروبی در نظر گرفته می‌شود (۵). باید اذعان داشت که عمده مطالعات صورت گرفته تاکنون راجع به بررسی فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه نشخوارکنندگان می‌باشد، و گزارشی مبنی بر ارتباط فعالیت آنزیمی روده بزرگ یا سکوم علفخواران به ویژه خرگوش، انجام نشده است.

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه تشنه‌داری توانسته فعالیت‌های میکروبی و آنزیمی روده فراخ خرگوش را تحت تأثیر قرار دهد، به‌طوری که فعالیت‌های میکروبی با مصرف این گیاه کاهش یافته و نهایتاً منجر به تولید کمتر گاز و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار شده است. کاهش قابلیت هضم ماده خشک جیره با تغذیه سطوح زیاد عصاره تأیید کننده کاهش جمعیت میکروبی و به تبع کاهش فعالیت آنزیمی می‌باشد. وجود ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه تشنه‌داری به ویژه در سطوح زیاد، احتمال دارد موجب کاهش جمعیت میکروبی دستگاه گوارش شود. فلاونوئیدها به‌طور مستقیم و یا از راه تولید مشتقات جدید با عمل تخریب، فعالیت میکروبی شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۷،۱۱). محققین نشان داده‌اند که با تغذیه گیاه تشنه‌داری به گوسفند، کل جمعیت پروتوزوای شکمبه و زیرخانواده‌های آن (شامل *انتودینیوم*^۱، *دیپلودینیوم*^۲، *اپیدینیوم*^۳ و *افریوسکولکس*^۴) کاهش یافت (۱۶). در نشخوارکنندگان که دارای تخمیر پیش معده‌ای هستند، نشان داده شده است که کوئرستین سریعاً در شکمبه تجزیه شده و متابولیت‌های اصلی حاصل از آن شامل سه و چهار دی‌هیدروکسی فنیل استیک اسید^۵ و ۴- متیل کاتکول^۶ بوده و کل تولید گاز و متان تحت تأثیر کوئرستین قرار نگرفته است (۶). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که مکمل کردن جیره خرگوش با عصاره گیاه تشنه‌داری باعث کاهش گاز تولیدی، پتانسیل گاز تولیدی و pH محیط کشت شد.

با توجه به نتایج به دست آمده عصاره گیاه تشنه‌داری توانسته فعالیت‌های میکروبی و آنزیمی روده بزرگ خرگوش را تحت تأثیر قرار دهد. به‌طوری که فعالیت‌های میکروبی با مصرف این گیاه کاهش یافته و نهایتاً منجر به تولید کمتر گاز و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار شده است. بنابراین با توجه به دسترس بودن این گیاه در بعضی مناطق، شاید بتوان به‌عنوان یک عصاره برای خرگوش استفاده کرد. ولی با این وجود با توجه به آزمایشات محدود در این زمینه برای درک بهتر اثرات عصاره تشنه‌داری نیاز به انجام مطالعات بیشتری می‌باشد.

با افزایش دوز مصرفی عصاره گیاه تشنه‌داری حجم گاز تولیدی در سکوم خرگوش‌ها کاهش یافت که می‌تواند نشان دهنده تأثیر منفی آن بر فعالیت باکتریایی باشد. کاهش تولید گاز توسط خاصیت ضد میکروبی *لینالول* و *فلاونوئیدها* قبلاً گزارش شده است (۹،۱۷). ممکن است کاهش تولید گاز به‌دلیل خواص ضد میکروبی گیاه تشنه‌داری باشد. احتمال دارد که گیاه تشنه‌داری به‌علت داشتن ترکیبات ضد میکروبی مانند *لینالول* و *فلاونوئیدها* سبب محدود شدن فعالیت میکروارگانسیم‌های روده بزرگ خرگوش شده باشد. کاهش میزان کل اسیدهای چرب فرار ممکن است نشان‌دهنده تأثیر عصاره گیاه تشنه‌داری بر فعالیت میکروبی روده فراخ باشد که می‌تواند فعالیت کل جمعیت میکروبی (پاتوژن و غیر پاتوژن) را تحت تأثیر قرار دهد. اما این کاهش در دوزهای مختلف صرف عصاره برای اسیدهای چرب نتایج متفاوتی داشت. به طوری که در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بیشترین کاهش برای اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک و اسید والریک بود، اما در دوز ۳۰۰ میلی‌گرم اسید بوتیریک و در دوز ۴۰۰ میلی‌گرم اسید استیک، اسید پروپیونیک و اسید ان والریک و در نهایت کل اسیدهای چرب فرار افزایش یافت. نتایج مربوط به کاهش حجم گاز تولیدی در شرایط آزمایشگاهی با افزایش سطح عصاره در مطالعه حاضر می‌تواند تأییدکننده کاهش غلظت کل اسیدهای چرب فرار، استات و بوتیرات در تیمارهای مربوطه باشد. زیرا گاز زمانی تولید می‌شود که کربوهیدرات و پروتئین‌های جیره غذایی به استات و بوتیرات تخمیر شوند (۹). گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد فلاونوئیدها به‌طور مستقیم و یا از راه تولید مشتقات جدید با عمل تخریب، فعالیت میکروبی شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۵،۷). کاهش جمعیت پروتوزوای شکمبه به‌دلیل متابولیت‌های ثانویه و ساختار فنولیک آن‌ها بوده که این ساختار به پاره شدن غشاء یاخته، غیر فعال شدن آنزیم‌ها و کاهش یون‌های فلزی و بستری لازم برای سوخت و ساز یاخته می‌انجامد (۳). این اثرات متفاوت از عصاره گیاه تشنه‌داری بر غلظت اسیدهای چرب فرار می‌تواند نشان دهنده سازگاری جمعیت میکروبی با آن باشد. افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز می‌تواند نشان‌دهنده حضور نشاسته بیشتر در انتهای دستگاه گوارش خرگوش‌ها باشد (۷) و لذا می‌توان اذعان کرد که مصرف عصاره گیاه تشنه‌داری باعث عبور نشاسته بیشتری از روده باریک به روده فراخ و دفع نشاسته و تخمیر آن شده است که می‌تواند یکی از دلایل کاهش وزن نهایی در خرگوش‌های دریافت‌کننده ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره باشد. آنزیم‌های میکروبی شکمبه نشخوارکنندگان یا روده فراخ علفخواران مرتبط با ظرفیت تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط جمعیت مخلوط میکروبی خود بوده و به‌عنوان شاخصی برای

1- Entodinium

5- 3,4- Dihydroxyphenylacetic acid

2- Diplodinium

6- 4- Methylcatechol

3- Epidinium

4- Ophryoscolex

منابع

1. Abarghuei, M.J. and Y. Rouzbahan. 2013. Influence of grape pomace extract on *in vitro* gas production kinetics and on ruminal unicellular population of inoculum in sheep. Iranian Journal of Animal Science, 44(4): 375-384.
2. Abassi, N.F., J. Azizi and M. Seifmanesh. 2007. Antimicrobial effect of extracts of (*Scrophularia striata*) on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa and comparison with selective effective antibiotics. Journal of Medicinal Plants, 6(1): 10-18.
3. Agarwal, N., I. Agarwal, D.N. Kamra and L.C. Chaudhary. 2000. Diurnal variations in the activities of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen contents of Murrah buffalo. Journal of Applied Animal Research, 18: 73-80.
4. Amiri, H., H. Lari Yazdi, A. Ismaili, M.F. Samsa, D. Eqbali, G.H. Wissarmi, B. Dostari and A. Nourmohammadi. 2011. Identification of essential oil constituents and investigation of secretory structures of Scrophularia striata Boiss. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 2(27): 271-278.
5. Azizi-Shotorkhoft, A., A. Sharifi, A. Azarfar and A. Kiani. 2018. Effects of different carbohydrate sources on activity of rumen microbial enzymes and nitrogen retention in sheep fed diet containing recycled poultry bedding. Journal of Applied Animal Research, 46: 50-54.
6. Bahrani, A. and A. Valadi. 2010. Effect of Scrophularia ethanolic leaves extracts on Staphylococcus aureus. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 6: 393-396.
7. Beauchemin, K.A., M. Kreuzer, F.O. Mara and T.A. McAlliste. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture, 48: 21-27.
8. Blummel, M., A. Karsli and J.R. Russell. 2003. Influence of diet on growth yields of rumen microorganisms *in vitro* and *in vivo*: Influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. British Journal of Nutrition, 90: 625-634.
9. Getachew, G., M. Blummel, H.P.S. Makkar and K. Becker. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Animal Feed Science and Technology, 72: 261-281.
10. Ghanbar, F., A. Alaei, J. Bayatkouhsar and F. Farivar. 2019. Evaluation of nutritional value of vicia faba residues processed with some chemical compounds using *in vitro* and nylon bag Techniques. Research on Animal Production, 10(26): 19-26 (In Persian).
11. Kohwand, M. and M. Maleki. 2014. *In vitro* study of the effects of some of yarrow (*Achillea millefolium*) essential oils on parameters of digestion and rumen fermentation in sheep. 6th Animal Sciences Congress, University of Tabriz.
12. Marten, G.C. and R.F. Barnes. 1980. Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzyme systems [ruminants, domesticated birds]. In Workshop on Standardization of Analytical Methodology for Feeds, 12-14.
13. Nogueira Filho, J.C.M, M. Fondevila, A. Barrios Urdaneta and M. Gonzalez Ronquillo. 2000. *In vitro* microbial fermentation of tropical grasses at an advanced maturity stage. Animal Feed Science and Technology, 83: 145-157.
14. Rezaei, F., T. Mohammad Abadi, M. Chaji and R. Mashayekhi. 2016. The effect of phenolic compounds of Scrophularia striata Boiss powder on feed intake, nutrient digestibility, rumination behavior and rumen protozoa population in Lori Bakhtiari sheep. Iranian Animal Science, 47(1): 155-164.
15. Soltani, N.K., F. Ghanbari, K.J. Bayat and F. Taliey. 2018. Effect of chemical and biological processing methods on chemical composition, gas production parameters and *in vitro* digestibility of cicer arietinum wastes. Research on Animal Production, 9(22): 72-82.
16. Shoohani, B. and A.A. Hemati. 2010. Effects of scrophularia striata extract on wound healing in rabbit. Ilam University of Medical Sciences Journal. 4: 9-16.
17. Talatpayeh, F.P. and B. Ali. 2014. Effect of savory essential oil with barley or corn diet on yield, rumen fermentation and blood parameters of native children of west Azerbaijan. Journal of Animal Science, 102: 21-28.
18. Uladshnebi, S.M. and M. Chaji. 2014. Effects of essential oil of native medicinal herb (*Salvia mirzayanii*) on rumen microbial fermentation and nutrient digestibility by using gas production system and continuous dual culture. Iranian Journal of Animal Science Research, 6(1): 54-65.

Effect of *Scrophularia striata* Boiss Extract on *in Vitro* Gas Production Parameters, Concentration and Volatile Fatty Acids Profile and Hydrolytic Enzyme Activity in Ceca Contents of Male Adults Rabbits

Zahra Shamsi Biranvandi¹, Ali Kiani², Afra Khosravi³ and Ayub Azizi⁴

1- Ph.D. Candidate in Animal Nutrition, Department of Animal Sciences, Lorestan University
(Corresponding author: biranandi2019@gmail.com)

2 and 4- Associate Professor and Associate Professor in Animal Nutrition, Department of Animal Sciences, Lorestan University

3- Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam
Received: June 20, 2020 Accepted: August 12, 2020

Abstract

In this study, the effect of different levels of *Scrophularia striata* extract on the parameters of laboratory gas production, the concentration of volatile fatty acids and the activity of hydrolytic enzymes on the contents of the cecum of adult male rabbits were investigated. For this purpose, 20 New Zealand rabbits weighing approximately 1.6 ± 0.2 kg (5 months and up) were used in a completely randomized design with four treatments and five replications. Treatments included 1) without receiving *Scrophularia striata* extract (control), and supplementing the control diet with levels of 2) 200, 3) 300 and 4) 400 mg of *Scrophularia striata* extract per kg of body weight. The control group received 2 ml of water instead of the extract. At the end of the experimental period and after slaughter of rabbits, the contents of their cecum were sampled and the parameters of gas production, concentration of volatile fatty acids and activity of hydrolytic enzymes of cecal sample were determined. The results showed that consumption of *Scrophularia striata* extract reduced the volume of gas produced ($p < 0.05$) and the total amount of volatile fatty acids ($p = 0.01$). Consumption of *Scrophularia striata* extract increased the activity of alpha-amylase ($p = 0.02$) and microcrystalline cellulase ($p = 0.01$) linearly, but did not significant effect on carboxymethylcellulose and filter paper decomposition activity. In general, the extract of the *Scrophularia striata* was able to affect the microbial and enzymatic activities of the rabbit colon, so that the microbial activity decreased with the consumption of this plant and eventually led to less gas production and reduced production of volatile fatty acids.

Keywords: Gas Production Test, Rabbit, *Scrophularia striata* Boiss, Enzyme Activity