Animal Production Research
Vol. 13, No. 4, 2024 (67-81)
doi: 10.22124/ar.2024.22957.1724
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872
University of Gullan

RESEARCH PAPER OPEN ACCESS

Effect of different methods of AD_3E supplementation on performance, fermentation, rumen protozoa, and blood metabolites of fattening lambs by *in vivo* and *in vitro* experiments

S. Nazari Darabkhani[1], M. E. Nooriyan Soroor[2,3*], M. M. Moeini[4]

1. MSc Student, Animal Science Department, Agriculture and Natural Resource Faculty, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Assistant Professor, Animal Science Department, Agriculture and Natural Resource Faculty, Razi University, Kermanshah, Iran
3. Assistant Professor, Animal Science Department, Agriculture Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
4. Associate Professor, Animal Science Department, Agriculture and Natural Resource Faculty, Razi University, Kermanshah, Iran

(Received: 14-11-2022 – Revised: 26-10-2024 – Accepted: 29-10-2024)

Introduction: Animals need vitamins A, D_3, and E to improve their performance and health. Vitamin A has an active role in maintaining all epithelial cells in the body and plays an important role in bone growth. Vitamin D_3 plays an important role in increasing the absorption of calcium and phosphorus, in addition to the formation and calcification of the bones in animals. Vitamin E is a fat soluble vitamin which is both a growth-promoting vitamin and is considered an antioxidant. These vitamins also play an important role in improving the immune system in ruminants. Ruminants cannot produce vitamins A, D_3, and E in their body; therefore, to meet physiological requirements and maintain high production performance, they need to be provided with an exogenous regular intake of vitamins A, D_3, and E in their diet. Several studies have been carried out on the effects of dietary or injectable vitamin AD_3E supplements on fattening lambs. This study aimed to determine the effects of various forms of AD_3E supplementation on growth performance, rumen fermentation, protozoa population, and blood parameters in Mehraban lambs by *in vivo* and *in vitro* experiments.

Materials and methods: The project comprised two *in vitro* and *in vivo* experiments. In this experiment, the *in vivo* growth parameters such as final body weight, total weight gain, average daily gain, average daily gain, dry matter intake, feed conversion ratio, the ruminal fermentation parameters such as pH, ammonia nitrogen, total volatile fatty acids, blood biochemical metabolites [blood urea nitrogen (BUN), cholesterol, triglyceride, glucose, albumin, HDL, LDL, and malondialdehyde (MAD)], protozoa count, and *in vitro* gas production, organic matter digestibility, methane gas production, metabolizable energy, and short-chain fatty acids were studied. This experiment consisted of a 14-day adaptation period and a 60-day experiment. Twenty Mehraban lambs (body weight of 41.3±0.5 kg) were divided into four groups with five replicates in each group using a completely randomized design. The treatments included 1) the control group received a base diet without vitamin supplements, 2) injectable vitamin AD_3E, 3) rumen-protected vitamin AD_3E as a part of concentrate, and 4) AD_3E vitamin in drinking water. Feed intake and body weight of lambs were recorded weekly during the fattening period. The samples of blood and rumen liquid were collected from the lambs on the 30th and 60th days of the experiment.

Results and discussion: The results indicated that the gas production, digestible organic matter, metabolizable energy, and short-chain fatty acids were reduced due to vitamin AD_3E supplementation compared with the control group ($P<0.05$). Growth performance was not different when supplemented with AD_3E, but for the rumen-protected vitamin, the average daily increase was 48 g more than that in the control group. The feed conversion ratio showed a significant decrease in AD3E water-soluble vitamins compared with the control group ($P<0.05$). The pH was not influenced by experimental treatments. The ammonia concentration was higher in treatments 3 and 4 ($P<0.05$), and the protozoa count was reduced due to vitamin AD_3E supplementation ($P<0.05$). The BUN

* Corresponding author: m.nooriyansoroor@basu.ac.ir

CC BY

serum concentration was lower in treatments 2 and 3 compared with other treatments (P=0.008). Vitamin supplementation with AD_3E administered in water or its injection made a significant increase in cholesterol concentration (P=0.002). Blood concentration of triglyceride showed a significant increase in treatment 4 (P=0.007). Plasma concentration of HDL was lower in lambs who received rumen-protected AD_3E compared to the control group (P<0.05). Experimental treatments did not affect plasma glucose, total protein, albumin, LDL, and MAD concentrations of fattening lambs (P>0.05). Plasma concentration of BUN on day 60 was higher compared to the 30th day in all treatments (P<0.05). However, plasma concentrations of triglyceride and glucose were lower on day 60 compared to the 30th day of the experiment in all groups.

Conclusions: Results showed that vitamin AD_3E had no significant effect on growth performance; however, it was greater in the vitamin group treated with rumen protection than in the control group. Gas production, protozoa population, and ammonia nitrogen decreased compared to control. Higher doses of vitamins, especially the rumen-protected vitamin AD_3E, are recommended in larger sample sizes and for longer periods.

Keywords: Fattening lamb, Fermentation parameters, Growth performance, Blood metabolites, Vitamin AD_3E

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this project.

How to cite this article:

Nazari Darabkhani, S., Nooriyan Soroor, M. E., & Moeini, M. M. (2024). Effect of different methods of AD_3E supplementation on performance, fermentation, rumen protozoa, and blood metabolites of fattening lambs by *in vivo* and *in vitro* experiments. *Animal Production Research*, *13*(4), 67-81. doi: 10.22124/ar.2024.22957.1724

تحقیقات تولیدات دامی

سال سیزدهم/شماره چهارم/زمستان ۱۴۰۳ (۸۱-۶۷)

Animal Production Research

مقاله پژوهشی

اثر روش‌های مختلف تجویز ویتامین AD_3E بر عملکرد رشد، تخمیر، پروتوزوآی شکمبه و فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری با آزمایش برون‌تنی و درون‌تنی

صبا نظری دارابخانی[۱]، محمد ابراهیم نوریان سرور[۲و۳*]، محمد مهدی معینی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی

۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۴- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۳ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۰۵ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۸)

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر روش‌های مختلف تجویز ویتامین AD_3E بر عملکرد رشد، مصرف خوراک، تخمیر شکمبه، جمعیت پروتوزآ و فراسنجه‌های خونی در بره‌های پرواری نژاد مهربان با آزمایش برون‌تنی و درون‌تنی بود. در آزمایش اول، تعداد ۲۰ رأس بره نر چهار ماهه (با میانگین وزن زنده برابر با ۴۱/۳ کیلوگرم) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار آزمایشی به‌مدت ۱۴ روز سازگاری و ۶۰ روز پروار مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) گروه شاهد (جیره پایه و ویتامین مش غیر پوشش‌دار)، ۲) ویتامین AD_3E به‌صورت تزریقی، ۳) ویتامین AD_3E پوشش‌دار مصرفی در خوراک و ۴) ویتامین AD_3E به‌صورت محلول در آب بودند. وزن بره‌ها هر دو هفته یک‌بار (در چهار دوره ۱۴ روزه) اندازه‌گیری شد و در پایان روزهای ۳۰ و ۶۰ پرواربندی، نمونه‌های خون و مایع شکمبه از بره‌ها تهیه شد. در آزمایش دوم، با استفاده از مایع شکمبه اخذ شده، به روش برون‌تنی، کل حجم گاز تولیدی، گوارش‌پذیری و انرژی قابل سوخت و ساز ارزیابی شد. نتایج نشان داد کل حجم گاز تولیدی، گوارش‌پذیری ماده آلی، انرژی قابل سوخت و ساز و اسیدهای چرب زنجیر کوتاه تیمارهای دریافت‌کننده ویتامین نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان دادند (P<۰/۰۱). اشکال مختلف ویتامین تأثیری بر عملکرد رشد دام‌ها نداشت. ویتامین AD_3E به‌شکل‌های پوشش‌دار و محلول در آب، غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد (P<۰/۰۵). همه اشکال ویتامین نسبت به گروه شاهد موجب کاهش جمعیت پروتوزوآ شدند (P<۰/۰۵). غلظت نیتروژن اوره‌ای خون در دام‌های گروه مصرف‌کننده ویتامین تزریقی و پوشش‌دار نسبت به تیمار شاهد کمتر بود (P<۰/۰۱). میزان تری‌گلیسیریدهای خون تنها در شکل ویتامین AD_3E محلول در آب افزایش یافت (P<۰/۰۱). در کل، نتایج آزمایش حاضر نشان داد که مقادیر توصیه شده انواع ویتامین AD_3E تأثیری بر عملکرد رشد دام‌ها نداشت، اما غلظت نیتروژن اوره‌ای خون، جمعیت پروتوزوای شکمبه و کل حجم گاز تولیدی را کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: بره پرواری، فراسنجه‌های تخمیر، عملکرد رشد، متابولیت‌های خونی، ویتامین AD_3E

* نویسندهٔ مسئول: m.nooriyansoroor@basu.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2024.22957.1724

مقدمه

ویتامین‌های محلول در چربی در بدن گوسفند و بز قابل تولید نیستند، از این رو برای تأمین نیازهای فیزیولوژیکی و حفظ عملکرد تولید مطلوب، عرضه منظم این ویتامین‌ها لازم است. در نتیجه، ویتامین‌های A، D_3 و E (به‌ترتیب با نام رتینول، کوله‌کلسیفرول و توکوفرول) باید در جیره این دام‌ها گنجانده شوند (Hafez *et al.,* 2012). بخشی از ویتامین‌های غیر پوشش‌دار در شکمبه تخریب می‌شوند. در تحقیقی نشان داده شده است که میزان تخریب ویتامین رتینول بسته به ترکیب جیره متفاوت است. در جیره شامل ۷۰-۵۰ درصد کنسانتره، میزان ۷۲-۶۷ درصد ویتامین رتینول بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون تخریب شد. در حالی‌که وقتی جیره حاوی بیش از ۷۵ درصد علوفه بود، میزان تخریب برابر با ۲۰-۱۶ درصد بود (Rode *et al.,* 1990). استفاده از مکمل‌های خوراکی مختلف نشان داده است که ویتامین AD_3E باعث بهبود افزایش وزن گوساله‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد، که این بهبود در گروه مصرف‌کننده ویتامین AD_3E می‌تواند مربوط به اثر ویتامین‌های رتینول، کوله‌کلسیفرول و توکوفرول بر افزایش اشتها و خوش‌خوراکی جیره باشد که سبب افزایش مصرف ماده خشک و در نهایت، بهبود رشد و افزایش وزن حیوانات در آزمایش شده است (Habeeb *et al.,* 2017). در پژوهشی، مکمل کردن جیره بره‌های جوان با ویتامین رتینول (۶۶۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین در کیلوگرم ماده خشک جیره)، مصرف خوراک، افزایش وزن روزانه، وزن نهایی و وزن لاشه را تحت تأثیر قرار نداده است (Arnett *et al.,* 2007). در آزمایش مشابه دیگری، افزایش وزن روزانه، مصرف ماده خشک و ضریب تبدیل غذایی بره‌ها با مکمل کردن جیره با ویتامین رتینول تحت تأثیر قرار نگرفت (Gorocica-Buenfil *et al.,* 2007). نشان داده شده است که با افزایش غلظت رتینول در جیره بره‌های پرواری، رشد آن‌ها به‌میزان ۶۳ گرم در روز نسبت به گروه شاهد بهبود یافت (Abdelhamid *et al.,* 1992). افزودن ویتامین کوله‌کلسیفرول به میزان شش میلیون واحد بین‌المللی در کیلوگرم ماده خشک در جیره گوساله‌ها، مصرف ماده خشک را کاهش داد (Karges *et al.,* 1999). این نتایج، یافته‌های قبلی را مبنی بر کاهش ماده خشک مصرفی در گوساله‌های یک‌ساله که سطوح بالایی از ویتامین کوله‌کلسیفرول را دریافت کردند، تائید می‌کند (Karges *et al.,* 1999). اگرچه برخی مطالعات نشان داده است که ویتامین توکوفرول تأثیری روی رشد ندارد (Berthelot *et al.,* 2014). دریافت روزانه ۴۵ میلی‌گرم مکمل ویتامین توکوفرول به‌مدت ۷۵ روز، بهبود ۸/۸ درصدی ضریب تبدیل خوراک و هم‌چنین، افزایش ۶/۷ درصدی افزایش وزن روزانه در بره‌ها را ایجاد نمود، اما تأثیری بر عملکرد پروار مشاهده نشد (Macit *et al.,* 2003). مطالعات در بزهای شیری نشان داد که با مصرف روزانه چهار گرم کولین و ۲۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین توکوفرول محافظت شده، فقط کولین محافظت شده بر تولید شیر مؤثر بود. ویتامین توکوفرول تأثیری بر فراسنجه‌های خونی بزها نداشت. مکمل ویتامین و مواد معدنی در سطوح مختلف در گوساله‌ها باعث افزایش گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی، افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار و تولید گاز متان شده است (Bonet *et al.,* 2003). در گوساله‌هایی که جیره حاوی مکمل ویتامین و مواد معدنی دریافت کردند، غلظت پروپیونیک اسید و آمونیاک شکمبه بیشتر از گروه شاهد بود (Bonet *et al.,* 2003). این در حالی است که ضریب هضم پروتئین خام، الیاف خام، pH و جمعیت پروتوزوآی شکمبه تحت تأثیر مکمل ویتامین و مواد معدنی قرار نگرفت (Astawa *et al.,* 2011). مطالعات نشان داده است که ویتامین توکوفرول باعث افزایش فعالیت میکروبی (Tagliapietra *et al.,* 2013)، فعالیت پروتوزوآیی (Naziroðlu *et al.,* 1997)، تخمیر شکمبه (Wei *et al.,* 2015) و هضم سلولز شکمبه‌ای (Hino *et al.,* 1993) می‌شود. غلظت استات و پروپیونات در گاو، گوسفند و بز تحت تأثیر سطوح مختلف ویتامین توکوفرول (۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰ و ۱۲۰۰۰ واحد ویتامین در روز) قرار نگرفت. همچنین، در مقایسه با گروه شاهد، غلظت بوتیرات و کل اسیدهای چرب فرار شکمبه، کاهش و نسبت استات به پروپیونات، هضم ماده خشک و ماده آلی، افزایش یافت (Hernández-Mendo *et al.,* 2017). نتایج بررسی تأثیر ویتامین AD_3E بر غلظت متابولیت‌های خونی گاومیش نشان داد که مصرف AD_3E به مقدار ۱۵ و ۳۰ گرم در روز به‌مدت ۱۰۵ روز موجب افزایش غلظت گلوکز، گلوبولین و پروتئین کل سرم در گروه دریافت‌کننده مکمل AD_3E شد (Daniels *et al.,* 2000). تزریق عضلانی ویتامین AD_3E به میزان دو و چهار میلی‌لیتر با فواصل زمانی هر دو هفته یک‌بار در قوچ‌های عربی سبب افزایش

غلظت پروتئین کل، آلبومین و گلوتامین سرم خون شد (Asadian *et al.,* 1996). همچنین، تزریق عضلانی دو و چهار میلی‌لیتر ویتامین‌های AD_3E به‌مدت هر دو هفته یک‌بار در بز دمشقی باعث افزایش غلظت گلوبولین و پروتئین کل سرم خون شد (Habibian *et al.,* 2015)، در حالی که در مطالعه دیگری، اثر مکمل سلنیوم، ویتامین توکوفرول و AD_3E بر غلظت مالون دی آلدئید گاوهای هلشتاین در شرایط تنش اکسیداتیو، مثبت ارزیابی شد (Aktas *et al.,* 2011). مکمل سلنیوم و ویتامین توکوفرول به‌صورت تزریقی موجب افزایش غلظت گلوکز و تری‌گلیسریدهای خون شد، اما تأثیری بر سطح کلسترول و لیپوپروتئین‌ها نداشت. همچنین، فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در هر دو تیمار تزریقی و خوراکی نسبت به گروه شاهد افزایش یافت.

از آنجایی که مطالعات اندکی در خصوص بررسی تاثیر انواع ویتامین AD_3E روی بره‌های پرواری گزارش شده است، هدف این تحقیق، بررسی تأثیر روش‌های مختلف تجویز ویتامین AD_3E بر فراسنجه‌های عملکرد رشد، فراسنجه‌های تخمیر شکمبه، جمعیت پروتوزوآیی و فراسنجه‌های خونی بره‌های مهربان بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، تعداد ۲۰ رأس بره نر هفت ماهه نژاد مهربان (با میانگین وزن زنده برابر با ۴۱/۳ کیلوگرم) در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار گروه پنج رأسی به‌مدت ۵۶ روز پروار شدند. کلیه بره‌ها در دوره سازگاری، داروهای ضدانگل آیورمکتین، آلبندازول و لوامیزول+تریکلابندازول و دو مرتبه واکسن آنتروتوکسمی را دریافت کردند. بره‌ها هر ۱۴ روز یک‌بار و برای چهار دوره، وزن‌کشی شدند و وزن در روز ۵۶ به‌عنوان وزن نهایی ثبت شد. نیاز گوسفندان به مواد مغذی (جدول ۱) بر اساس توصیه NRC (2007) برآورد شده و آب تازه به‌صورت مداوم در اختیار آن‌ها قرار داشت. بره‌ها، جیره‌های آزمایشی کامل مخلوط شامل ۱) جیره شاهد (جیره پایه با مکمل AD_3E غیر پوشش‌دار مش، ۲) ۰/۱ سی‌سی ویتامین AD_3E به‌ازای هر بره در روز به‌صورت تزریقی (هر میلی‌لیتر حاوی ۸۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین رتینول، ۴۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین کوله‌کلسیفرول و ۲۰ میلی‌گرم توکوفرول)، ۳) ۱۶ گرم ویتامین AD_3E به‌ازای هر بره در روز به‌صورت پوشش‌دار (محافظت شده در شکمبه که هر یک کیلوگرم آن حاوی ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین رتینول، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین کوله‌کلسیفرول و ۱۰۰ میلی‌گرم توکوفرول بود) و ۴) ۴۰ میکرولیتر ویتامین AD_3E به‌ازای هر بره در روز به‌صورت مخلوط در آب (هر یک میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین رتینول، ۲۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین کوله‌کلسیفرول و ۴۰ میلی‌گرم توکوفرول) دریافت نمودند. دسترسی بره‌ها به خوراک در حد اشتها بود، به‌گونه‌ای که همواره حداقل پنج درصد پسمانده خوراک داشته باشند. مواد معدنی افزودنی به خوراک دام بدون ویتامین رتینول، کوله‌کلسیفرول و توکوفرول بود. خوراک روزانه گوسفندان در سه وعده (درساعات ۸، ۱۴ و ۱۹) توزیع و صبح روز بعد، باقیمانده خوراک روز قبل جمع‌آوری و توزین شد. ویتامین AD_3E پوشش‌دار با مقادیری سبوس مخلوط شده و هر روز در وعده صبح قبل از توزیع غذا به بره‌ها خورانده شد. ویتامین AD_3E به‌صورت مخلوط در آب آشامیدنی تمیز افزوده شد و ویتامین تزریقی هر روز به بره‌ها تزریق شد.

جدول ۱- اقلام خوراکی و ترکیب مواد مغذی جیره پایه

Table 1. Ingredients and nutrient composition of basal diet

Ingredient	Value (%)
Straw	30
Barley Grain	23
Corn Grain	20
Meat Meal	15
Vinas	8.2
Sodium Bicarbonate	1.3
Min mixture without Vit	2
DCP	0.3
Salt	0.2
Chemical composition	
Dry Matter (%)	93.0
Organic Matter (%)	93.65
Ash	6.35
Crude Protein (% DM)	14.2
Ether Extract (% DM)	5.73
Metabolizable energy (MJ/kg)	9.96

انرژی قابل سوخت و ساز جیره پایه بر اساس معادله ارائه شده به‌وسیله Menke and Steingass (1988) به‌صورت زیر محاسبه شد:

$$ME_{(MJ/kg\ DM)} = 2.20 + (0.136 \times GP) + (0.057 \times CP) + (0.0029 \times EE^2)$$

که در این معادله، GP= گاز تولیدی (میلی‌لیتر)، CP= پروتئین خام (میلی‌گرم در هر ۲۰۰ میلی‌گرم) و EE= چربی خام (میلی‌گرم در هر ۲۰۰ میلی‌گرم) بود.

آزمون تولید گاز برون‌تنی: این بخش از آزمایش با هدف اندازه‌گیری فراسنجه‌های تخمیر، گاز تولیدی و انرژی قابل سوخت و ساز و اسیدهای چرب فرار انجام شد. مایع شکمبه در روزهای ۳۰ و ۶۰ پروار با لوله مری و در حالت ناشتا از همه گوسفندان (۲۰ راس)، چهار تیمار گرفته شده (۵۰ میلی‌لیتر) و با چهار فلاسک جداگانه به آزمایشگاه منتقل شد. از هر فلاسک، تعداد پنج تکرار (پنج بطری ۱۲۰ میلی-لیتری) تهیه شد. پنج بطری هم که فقط حاوی مایع شکمبه (گروه شاهد بره‌ها) بدون سوبسترا بود به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد. در شرایط بی‌هوازی، مایع شکمبه با نسبت یک به دو با بافر بی‌کربنات مخلوط شد و سپس، میزان ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری به هر یک از بطری‌های ویتن حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم جیره پایه اضافه شد (Menke and Steingass ,1988). محیط‌های تخمیر یا همان بطری‌های ویتن ۱۲۰ میلی‌لیتری و محتویات داخل آن در دمای ۳۹ درجه سلسیوس و به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. از آون دارای سیستم لغزاننده به-عنوان گرمخانه استفاده شد. انرژی قابل سوخت و ساز تیمارهای مورد مطالعه با استفاده از رابطه زیر برآورد شد (Menke and Steingass,1988)

$$ME_{MJ/kg\ DM} = [(۲/۲) + (۰/۱۳۶\times GP) + (۰/۰۵۷CP) + (۰/۰۰۲۹\times EE^2)]$$

که در این رابطه، ME: انرژی قابل سوخت و ساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)، GP: گاز تولیدی ساعت ۲۴ به-ازای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا (میلی‌لیتر)، CP: پروتئین خام (گرم در کیلوگرم ماده خشک) و EE: عصاره اتری (گرم در کیلوگرم ماده خشک) بود.

غلظت کل اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر (میلی‌مول در لیتر) با استفاده از رابطه زیر (Getachew *et al.*, 2002) و روش Barnet and Reid (1975) با استفاده از دستگاه مارخام برآورد شد:

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

اندازه‌گیری عملکرد رشد: وزن‌کشی همه دام‌ها با استفاده از باسکول دیجیتال به‌صورت ناشتا و دو هفته یک‌بار انجام شد. سپس، افزایش وزن روزانه و شاخص ضریب تبدیل خوراک با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

$$ADG\ gr/d = \frac{Total\ W - Intial\ W}{day}$$

$$FCR = \frac{DMI\ kg}{ADG\ kg}$$

که در این روابط، ADG= افزایش وزن روزانه (گرم در روز)، Total W= وزن نهایی کل، Initial W= وزن اولیه و day= روزهای پروار، FCR= ضریب تبدیل خوراک، DMI= ماده خشک مصرفی کل دوره (کیلوگرم) و ADG= افزایش وزن کل دوره (کیلوگرم) بود.

مقدار خوراک مصرفی در حد اشتهای روزانه همه دام‌ها دقیقاً ثبت شد. نمونه‌هایی از خوراک روزانه بره‌ها جمع‌آوری و به آزمایشگاه تجزیه مواد خوراکی منتقل شد. مقادیر ماده خشک جیره، خاکستر خام، پروتئین خام و عصاره اتری جیره (جدول ۱) بر اساس روش‌های استاندارد (AOAC, 2007) اندازه‌گیری شد.

فراسنجه‌های تخمیر: برای مطالعه فراسنجه‌های تخمیر (pH شکمبه، غلظت نیتروژن آمونیاکی، کل اسیدهای چرب فرار، کل حجم گاز تولیدی در آزمون تولید گاز و انرژی قابل سوخت و ساز)، در روز ۳۰ و ۶۰ دوره پروار، مایع شکمبه قبل از خوراک‌دهی وعده صبح با لوله مری از همه دام‌ها گرفته شد. سپس، بلافاصله pH مایع شکمبه با دستگاه pHمتر (مدل قلمی سیار Shenzhen GRAIGAR Graigar Technology Co) اندازه‌گیری شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی در نمونه‌های مایع شکمبه با استفاده از روش فنول-هیپوکلریت اندازه‌گیری شد (Broderick *et al.,* 1980). در این روش، غلظت نیتروژن آمونیاکی با استفاده از معرف فنول، هیپوکلریت، استاندارد آمونیاک و با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 6850 ساخت کمپانی Jenway انگلستان)در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت کل اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول در لیتر) با استفاده از دستگاه شیشه‌ای مارخام تعیین شد (Barnet and Reid, 1957).

به‌منظور تعیین غلظت کل اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر شکمبه، بلافاصله پس از گرفتن مایع شکمبه از گوسفندان هر چهار گروه، مایع شکمبه هر گوسفند با اسید فسفریک ۲۰ درصد رقیق (چهار مایع شکمبه و یک اسید فسفریک)

شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه باقی ماندند تا پروتئین محلول رسوب کند. سپس، سانتریفیوژ (دمای ۴ درجه سلسیوس، ۱۴۰۰۰ دور، ۱۵ دقیقه) انجام شد. محلول شفاف رویی تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

برآورد هدرروی انرژی به‌شکل گاز متان (مگاژول در روز) با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (Ellis *et al.*, 2007):

$$CH_{4\ (MJ/d)} = ۳/۹۶(\pm ۱/۱۸) + ۰/۵۶۱(\pm ۰/۱۳۰) \times DMI_{(kg/d)}$$

$$CH_{4\ (MJ/d)} = ۲/۷۰(\pm ۱/۳۸) + ۱/۱۶(\pm ۰/۲۷۱) \times DMI\ (kg/d) - ۱۵/۸(\pm ۶/۸۶ \times EE\ (kg/d)$$

که در این معادلات، DMI: ماده خشک مصرفی و EE: عصاره اتری است.

شمارش جمعیت پروتوزوآ: شمارش پروتوزوآ در روز ۳۰ و ۶۰ و با استفاده از محلول رقیق‌کننده فرمال سالین و رقیق‌سازی نمونه شکمبه و شمارش به‌وسیله میکروسکوپ نوری انجام شد (Dehority, 2003). نمونه‌های مایع شکمبه با نسبت یک به پنج (یک مایع شکمبه، پنج فرمال سالین) با فرمال سالین مخلوط شد و تا روز شمارش در یخچال معمولی نگهداری شدند. با استفاده از نرم افزار دینو کاپچر نصب شده روی رایانه و میکروسکوپ نوری و لام هموسیتومتر، زیر خانواده‌های پروتوزوآ شامل انتودینینه‌ها، افریواسکالکس، دیپلودینینه، زیر خانواده ایزوتریشیدا و داسی‌تریشیدا با بزرگ‌نمایی 10x در نه تکرار برای هر تیمار شناسایی و شمارش شد (Ogimoto and Imai, 1981). تعداد پروتوزوآ در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$NP_{ml} = \frac{N}{\left[areamm\ .\ Dmm.\frac{1}{n}\right]} \times 1000$$

در این رابطه، NP: تعداد پروتوزوآی شمارش شده در هر میلی‌لیتر، N: تعداد پروتوزوآ در هر بار شمارش لام، areamm: مساحت هر بخش لام (یک میلی‌لیتر مربع)، Dmm: عمق هر بخش لام (۰/۱ میلی لیتر) و 1/n: ضریب رقت (برابر با یک پنجم) بود.

فراسنجه‌های بیوشیمایی خون : نمونه‌های خون نیز در دو دوره پروار ۳۰ و ۶۰ روزگی و با استفاده از سرنگ با نیدل نمره ۱۶ از سیاهرگ وداج گردن گرفته شد. نمونه خون سریعاً به‌درون لوله‌های ونوجکت حاوی هپارین منتقل شد و برای چندین مرتبه و به‌آرامی محتویات لوله، یکنواخت شد. پس از اتمام فرایند خون‌گیری، با استفاده از سانتریفیوژ معمولی (۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه)، پلاسمای خون جدا شد. پلاسمای جدا شده را به لوله‌های اپندورف دو میلی‌لیتری منتقل نموده و تا زمان اندازه‌گیری هر یک از فراسنجه‌های بیوشیمیایی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون شامل گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول، غلظت نیتروژن اوره ای خون (اوره خون ضرب در ضریب ۰/۴۶)، آلبومین، پروتئین کل، HDL، LDL و مالون دی آلدئید اندازه‌گیری شدند. مقادیر هر یک از متابولیت‌های پلاسما با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون محاسبه شد.

طرح آزمایش و تجزیه و تحلیل داده‌ها : داده‌های به‌دست آمده برای صفات عملکرد دام، مصرف خوراک، تخمیر شکمبه، جمعیت پروتوزوآیی و فراسنجه‌های خونی با استفاده از برنامه آماری SPSS 24.1 در دو سطح خطای نوع اول برابر با یک و پنج درصد در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه قرار گرفتند. مقایسه میانگین بین تیمارهای آزمایشی با آزمون دانت (جهت مقایسه تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد) و مقایسه میانگین‌های چندگانه با آزمون دانکن انجام گرفت.

به‌دلیل این که داده‌های مربوط به تعداد پروتوزوآ از نوع شمارشی هستند، ابتدا طبیعی بودن این داده‌ها با آزمون ناپارامتری کولموگوروف-اسمیرنوف در نرم افزار آماری SPSS 24.1 مورد بررسی قرار گرفت و سپس، تجزیه شدند. چون داده‌های فراسنجه‌های خونی و شمارش پروتوزوآ در دو روز ۳۰ و ۶۰ اندازه‌گیری شدند از طرح بلوک کامل تصادفی برای تجزیه داده‌ها استفاده شد. همچنین، برای مقایسه داده‌های هر تیمار بین روز ۳۰ با ۶۰، از روش آزمون t جفت‌شده استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که استفاده از مکمل ویتامین AD_3E به‌روش‌های مختلف تزریقی، پوشش‌دار و محلول در آب، تأثیر معنی‌داری بر هیچ‌یک از صفات رشد بره‌ها نداشت (جدول ۲)، هرچند از نظر عددی در گروه‌های مصرف‌کننده ویتامین AD_3E، افزایش وزن روزانه (۳۸-۲۸ گرم در روز) و افزایش وزن کل (۳-۲ کیلوگرم) بیشتر از تیمار شاهد بود. به‌نظر می‌رسد که چون تغییری در مقدار مصرف ماده خشک رخ

نداده است، عملکرد رشد دام‌های دریافت‌کننده انواع ویتامین نیز اختلافی با هم نداشته‌اند. بررسی‌های میدانی نیز نشان می‌دهد در صورتی که بخش علوفه جیره بدون یونجه باشد، رشد روزانه بره بیش از ۲۵۰ گرم در روز نخواهد شد. بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، در یک پژوهش، استفاده از مکمل‌های خوراکی ویتامین AD_3E به‌دلیل افزایش اشتها و خوش‌خوراکی جیره، سبب افزایش مصرف ماده خشک و به‌دنبال آن، بهبود افزایش وزن گوساله‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد (Habeeb *et al*., 2017).

به‌نظر می‌رسد معنی‌دار نشدن افزایش وزن بین تیمارهای آزمایشی می‌تواند بیان‌گر این مسئله باشد که احتمالاً دز مصرفی ویتامین‌های این مطالعه به اندازه‌ای نبوده که بتواند تأثیر قابل توجهی بر مقدار مصرف خوراک و رشد دام بگذارد. مشابه با نتایج حاضر، افزودن مکمل ویتامین رتینول (۶۶۰۰ واحد ویتامین در کیلوگرم ماده خشک جیره بره‌ها) (Arnett *et al.,* 2007) و افزودن مقادیر کم ویتامین رتینول (۲۲۰۰ واحد به‌ازای هر کیلوگرم ماده خشک ذرت با رطوبت بالا در جیره گوساله‌های پرواری) (Abdelhamid *et al.,* 1992) تأثیری بر اضافه وزن روزانه، مصرف ماده خشک و ضریب تبدیل غذایی دام‌ها نداشت (Gorocica-Buenfil *et al.,* 2007).

همچنین، مصرف ۲۸۶ و ۵۵۱ میلی‌گرم آلفا توکوفرول در هر کیلوگرم ماده خشک مصرفی جیره در مقابل گروه شاهد (۴۵ میلی‌گرم)، تأثیری بر رشد بره‌ها نداشت (Kasapidou *et al.,* 2012). در یک پژوهش، دریافت روزانه ۴۵ میلی‌گرم مکمل ویتامین توکوفرول به‌مدت ۷۵ روز، بهبود ۸/۸ درصدی در ضریب تبدیل خوراک و همچنین، افزایش ۶/۷ درصدی در اضافه وزن روزانه در بره‌ها را نشان داد، ولی تأثیری بر عملکرد پروار نداشت (Macit *et al.,* 2003). از طرفی، در بره‌های پرواری نشان داده شده است که با افزایش غلظت رتینول در خوراک (پنج برابر مقایر توصیه شده مقادیر توصیه نشده)، رشد بره‌ها به‌میزان ۶۳ گرم در روز بهبود می‌یابد (Abdelhamid *et al.,* 1992).

افزودن ویتامین کوله‌کلسیفرول به میزان شش میلیون واحد در کیلوگرم ماده خشک در جیره گوساله‌ها، ماده خشک مصرفی را کاهش داده است (Karges *et al*., 2001). این نتایج، یافته‌های قبلی را مبنی بر کاهش ماده خشک مصرفی در گوساله‌های یک‌ساله‌ای که سطوح بالایی از ویتامین کوله‌کلسیفرول را دریافت کردند، تائید می‌کند (Karges *et al.,* 1999). چون حدود ۵۲ درصد از ویتامین-های محلول در چربی در محیط شکمبه تجزیه می‌شوند (Leedle *et al.,* 1993)، به‌نظر می‌رسد در صورتی که مقدار ویتامین مصرفی در دو تیمار ویتامین خوراکی پوشش‌دار (محافظت شده در شکمبه) و محلول در آب افزایش می‌یافت، تفاوت افزایش وزن روزانه (گرم در روز) این دو گروه (به‌ترتیب ۳۸ و ۳۴ گرم بیشتر از گروه شاهد) افزایش پیدا می‌کرد. در هر دو روش اندازه‌گیری، میانگین افزایش وزن روزانه تیمار دریافت‌کننده AD_3E پوشش‌دار به‌لحاظ عددی مقدار بیشتری بود، گرچه معنی‌دار نشده بود.

یافته‌های حاصل از فراسنجه‌های تخمیری (جدول ۳) نشان می‌دهد که pH شکمبه در چهار تیمار آزمایشی با هم تفاوتی نداشت و در دامنه طبیعی اسیدیته شکمبه قرار دارند (Guo *et al*., 2019). همچنین، این تیمارها در روزهای ۳۰ و ۶۰ از نظر pH هم اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و با گروه شاهد نداشتند، اما میزان اسیدیته شکمبه در گروه تزریقی و پوشش‌دار در روز ۶۰ نسبت به روز ۳۰ بالاتر بود ($P<۰/۰۵$). مشابه با نتایج بررسی حاضر نیز گزارش شده است که استفاده از مکمل ویتامین و مواد معدنی (Astawa *et al*., 2011) و ویتامین توکوفرول (Hernández-Mendo *et al*., 2017)، تأثیری بر pH شکمبه‌ای ندارد. البته این مسأله از بعد دیگر یعنی تأثیر اسیدیته محیط بر ویتامین AD_3E نیز باید بررسی شود.

جدول ۲- اثر روش‌های مختلف مصرف ویتامین AD_3E بر عملکرد رشد و مصرف خوراک بره‌های پرواری

Table 2. Effect of different methods of vitamin AD_3E consumption on growth performance and feed intake of fattening lambs

Growth parameters	Treatments (different vitamin consumption methods)				SEM	*P*-value
	Control	Injection	Rumen-protected	Water soluble		
Initial body weight (kg)	41.55	41.94	41.76	41.23	1.00	0.955
Final body weight (kg)	52.30	54.28	51.72	55.67	1.22	0.962
Total weight gain (Kg)	10.75	12.34	12.68	13.61	0.540	0.522
Average daily gain (g/day)	191.96	220.35	226.56	243.08	9.65	0.355
Estimated average daily gain (g/day)*	198.80	242.00	247.60	232.60	10.64	0.393
Dry matter intake (kg/day)	2.05	2.15	2.20	2.21	0.019	1.00
Feed conversion ratio	10.44[a]	9.75[ab]	9.70[ab]	9.09[b]	0.674	0.963

*Estimated by regression method

آنچه که مسلم است در مطالعه حاضر شاخص pH در هر سه تیمار دریافت‌کننده ویتامین تفاوتی با گروه شاهد نداشت و در نتیجه، اسیدیته محیط تأثیری بر ویتامین‌های موجود در محیط شکمبه نداشته است.

نتایج فراسنجه‌های تخمیر شکمبه (جدول ۳) نشان می‌دهد ویتامین AD_3E در هر دو شکل پوشش‌دار و محلول در آب، غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه را نسبت به گروه شاهد افزایش داد ($P<۰/۰۵$)، اگرچه شاخص نیتروژن آمونیاکی همه تیمارها در دامنه طبیعی آن (۳۰۰-۸۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار داشت (McDonald *et al.,* 2010). هم سو با نتایج مطالعه حاضر، مشخص شده است که مکمل ویتامینی (Astawa *et al.,* 2011) و ویتامین رتینول (Abdelhamid *et al.*, 2009) منجر به افزایش غلظت آمونیاک می‌شود. به‌نظر می‌رسد حضور ویتامین AD_3E در محیط شکمبه توانسته است تولید آمونیاک را از راه تأثیر بر باکتری‌ها تحریک کند و احتمالاً این ویتامین‌ها می‌توانند فرایند پروتئولیز شکمبه را افزایش دهند.

تولید آمونیاک در شکمبه می‌تواند به‌دلیل شکار باکتری به‌وسیله پروتوزوآ و سوخت و ساز نیتروژن آن و همچنین، فعالیت باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک زیاد باشد (Mcintosh *et al.*, 2003). چون جمعیت پروتوزآیی در مطالعه حاضر، کاهش معنی‌داری داشته، لذا تأثیر پروتوزوآ بر غلظت آمونیاک قابل قبول نیست. همچنین، ممکن است به‌دلیل افزایش فعالیت دی‌آمیناسیون اسیدهای آمینه به‌وسیله باکتری‌ها و یا تحریک فعالیت باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک زیاد (Benchaar *et al.*, 2008) و یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز، غلظت نیتروژن آمونیاکی بیشتر شده باشد (Hussain and Cheeke, 1995).

تأثیر شکل‌های مختلف ویتامین AD_3E بر غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه و مقایسه زمان‌های مختلف نمونه‌برداری (جدول ۴) نشان داد که هیچ‌یک از تیمارها، اثر معنی‌داری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار به‌روش مارخام اعمال نکردند و اثر زمان هم در این رابطه، معنی‌دار نشد. این در حالی است که افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار در نتیجه استفاده از مکمل ویتامینی(Astawa *et al.,* 2011) و ویتامین رتینول (Abdelhamid *et al.*, 2009) و کاهش غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه در نتیجه استفاده از ویتامین E (Hernández-Mendo *et al.*, 2017)، گزارش شده است.

اگرچه اثبات شده است که هم‌خوانی بین نتایج روش درون‌تنی و برون‌تنی وجود ندارد (Ghorbani *et al.*, 2017)، ولی در روش برآوردی، غلظت کل اسیدهای چرب فرار فقط در ویتامین پوشش‌دار نسبت به دو تیمار دیگر کاهش محسوسی نداشته است. در روش برون‌تنی، گوارش‌پذیری ماده آلی کاهش یافته و در نتیجه، کل حجم گاز تولیدی نیز کاهش نشان می‌دهد. هدرروی انرژی ب شکل تولید متان در هر دو معادله ثابت بوده و به‌نظر می‌رسد که کاهش کل حجم گاز تولیدی در سه تیمار آزمایشی نسبت به گروه شاهد ناشی از کاهش حجم تولید دی‌اکسید کربن باشد. در مقایسه بین شاخص‌ها در روز ۳۰ با روز ۶۰، تنها pH دو تیمار حاوی ویتامین تزریقی و پوشش‌دار در روز ۶۰ کاهش نشان داد و غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمار حاوی ویتامین پوشش‌دار کاهش داشته است. در مقایسه بین

تیمارها با تیمار شاهد در روز ۳۰ و ۶۰، نتایج آزمایش نشان داد که غلظت نیتروژن آمونیاکی، روند افزایشی در دریافت‌کنندگان ویتامین دارد.

نتایج نشان داد که همه اشکال ویتامین در مقایسه با تیمار شاهد، اثر معنی‌داری بر جمعیت پروتوزوای کل و همچنین، انتودینیوم اعمال کرد و از راه کاهش جمعیت انتودینینه باعث کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) جمعیت کل شد (جدول ۵). انتودینیوم و دیپلودینیوم به‌ترتیب بیشترین و کمترین درصد جمعیت پروتوزآیی را به خود اختصاص داده‌اند. در مقایسات بین روز ۳۰ با روز۶۰ هم جمعیت انواع پروتوزآ بین تیمارهای آزمایشی تفاوتی با هم نداشت. کاهش جمعیت انتودینیوم و پروتوزوای کل در روز ۳۰ در همه گروه‌ها رخ داد. بررسی‌ها نشان داده است که جمعیت پروتوزوآی شکمبه تحت تأثیر مکمل ویتامین قرار نگرفت (Astawa *et al.,* 2011)، اما در مطالعه‌ای با استفاده از ۲۵۰ میلی‌گرم دی ال-توکوفرول استیل و ۳۰۰ میلی‌گرم سدیم سلنیت در هر کیلوگرم خوراک بره گزارش شد که ویتامین توکوفرول منجر به افت افزایش فعالیت پروتوزوآی شکمبه می‌شود (Naziroðlu *et al.,* 1997). مشابه بسیاری از مطالعات گذشته، جمعیت انتودینینه‌ها و دیپلودینینه‌ها در بین همه انواع پروتوزآ، به‌ترتیب بیشترین و کمترین درصد را به خود اختصاص داده‌اند.

اثر روش‌های مختلف مصرف ویتامین AD_3E بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون بره‌ها (جدول ۶) نشان می‌دهد که در بین فراسنجه‌های خونی مورد مطالعه تنها غلظت نیتروژن اوره‌ای خون، کلسترول، تری‌گلیسیرید و HDL تحت تاثیر تیمارهای مورد مطالعه قرار گرفت. میزان اوره خون در دام‌های گروه مصرف‌کننده ویتامین تزریقی و پوشش‌دار نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۱)، اما تفاوت معنی‌داری بین گروه محلول در آب با گروه شاهد، و تفاوتی بین سه گروه تزریقی، پوشش‌دار و محلول در آب با هم مشاهده نشد. ویتامین به‌شکل تزریقی و محلول در آب در مقایسه با دو گروه دیگر سبب افزایش غلظت کلسترول خون شد (P=۰/۰۰۲). از نظر غلظت تری‌گلیسیرید خون، تنها شکل محلول در آب ویتامین AD_3E تفاوت معنی داری نسبت به گروه شاهد نشان داد و افزایش یافت (P=۰/۰۰۷). میزان HDL خون در روز ۳۰ در همه تیمارها از نظر آماری مشابه بود، اما در روز ۶۰، در گروه تزریقی و پوشش‌دار کمتر از گروه شاهد بود. مقایسه فراسنجه‌های بین روز ۳۰ و ۶۰ نشان داد که تفاوتی در روز ۳۰ با ۶۰ در تمامی چهار تیمار مشاهده نشد. غلظت LDL و مالون دی آلدئید خون تحت تأثیر تیمار و زمان آزمایش قرار نگرفت (جدول ۷). Sharokhian Rezaee *et al.* (2015) در مطالعه اثر تزریق AD_3E در گاوهای شیری پرتولید در فصل تابستان بیان کردند که AD_3E به‌تنهایی تاثیری بر غلظت گلوکز و مالون دی آلدئید خون گاوها نداشت، اما نسبت به گروه شاهد، پروتئین کل، بیشتر و آلبومین خون، کمتر بود.

در مطالعه‌ای روی گاوها، غلظت گلوکز خون دام‌های دریافت‌کننده مکمل AD_3E نسبت به گروه هورمونی کمتر بود (Sharokhian Rezaee *et al.,* 2015). محققین بیان کردند که این کاهش می‌تواند به تأثیر منفی آن بر سلامت کبد و قابلیت گلوکونئوژنز کبدی در نشخوارکنندگان ارتباط داشته باشد (Sharokhian Rezaee *et al.,* 2015). افزایش اندک پروتئین کل و گلوبولین در گاوهای شیری (El-Nor, 2000)، در سرم خون بزهای ماده نوبی‌ین (Abdelatif *et al.,* 2009) و در سرم بزغاله‌ها (Habeeb *et al.,* 2017) در اثر مصرف AD_3E نیز مشاهده شده است.

مقدار ۱۰ میلی‌لیتر ویتامین AD_3E در دو زمان ۷ و ۲۸ روز قبل از زایمان میش‌های آبستن مورد بررسی قرار گرفته است (Shahbazi *et al.*, 2024). نتایج این بررسی روی فراسنجه‌های خونی نشان داد که در زمان چهار هفته قبل از زایش، هیچ تاثیری بر همه فراسنجه‌ها مشاهده نشد، ولی در زمان هفت روز قبل از زایش، گلوکز پلاسما، کاهش و پروتئین کل، افزایش نشان داد. افزایش پروتئین کل به افزایش سلامت سلول‌های کبدی و سیستم ایمنی و افزایش ساخت پروتئین به‌وسیله آنها نسبت داده می‌شود. از آنجایی که ویتامین‌های رتینول، کوله کلسیفرول و توکوفرول، نقش موثری بر سلامت سلول‌های کبدی دارند (Freund and Gotthart, 2017; El Hadi *et al.*, 2018; Pop *et al.*, 2022). در نتیجه، به‌نظر می‌رسد این ویتامین‌ها می‌توانند سبب بهبود متابولیک سلول‌های کبدی مانند ساخت پروتئین شوند. در مطالعه حاضر، غلظت LDL و MDA خون تحت تأثیر تیمار و زمان آزمایش قرار نگرفت (جدول ۷). مالون دی آلدهید به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غیراشباع سلول در نظر گرفته می‌شود و شاخص مناسبی برای تعیین وضعیت تنش اکسیداتیو است.

جدول ۳- اثر روش‌های مختلف مصرف ویتامین AD_3E بر فراسنجه‌های تخمیر بره‌های پرواری

Table 3. Effect of different methods of vitamin AD_3E consumption on fermentation parameters of fattening lambs

Fermentation parameters	Treatments (different vitamin administration methods)				Sampling time (day)		SEM	*P*-value		
	Control	Injection	Rumen-protected	Water soluble	30	60		Tr	Time	Tr*Time
In vivo										
pH	6.41	6.35	6.26	6.26	6.57	6.62	0.043	0.449	0.003	0.341
NH_3-N (mg/L)	179.43[c]	197.02[bc]	218.69[ab]	230.95[a]	186.37	200.5	6.13	0.003	0.240	0.014
Total volatile fatty acids (mmol/L)	86.70	85.80	88.20	85.20	84.90	88.50	1.73	0.931	0.342	0.972
In vitro										
Total gas production (mL)	52.40[a]	39.80[c]	48.80[b]	29.40[d]	-	-	2.06	0.001	-	-
Methane production (MJ/day)[1]	5.127	5.126	5.127	5.125			0.010	1.00	-	-
Methane production (MJ/day)[2]	4.203	4.203	4.203	4.201	-	-	0.022	1.00	-	-
Digestible organic matter (%)	61.46[a]	50.26[c]	58.26[b]	41.01[d]	-	-	1.83	0.001	-	-
Metabolizable energy (MJ/kg DM)	9.36[a]	7.64[c]	8.87[b]	6.23[d]	-	-	0.281	0.001	-	-
Short chain fatty acids (Mmol/L)[3]	115.90[a]	87.93[c]	107.91[b]	64.84[d]	-	-	4.58	0.001	-	-

[a-c] Means within the same row with different superscript letters had a significant difference ($P<0.05$).

SEM: Standard error of the means; Tr: Treatment

[1] CH_4= 3.96(±1.18) + 0.561(±0.130) × DMI; DMI: Dry matter intake

[2] CH_4= 2.70(±1.38) + 1.16(±0.271) × DMI – 15.8(±6.86) × EE; EE: Ether extract

[3] SCFA=[(0.222×GP)-0.00425]×100; GP: Gas production

جدول ۴- اثر روش‌های مختلف مصرف ویتامین AD_3E بر فراسنجه‌های تخمیر در روزهای ۳۰ و ۶۰ پروار بره‌ها

Table 4. Effect of different methods of vitamin AD_3E consumption on fermentation parameters at 30 and 60 days of fattening lambs

Fermentation parameters	Sampling time (day)	Treatments (different vitamin administration methods)				SEM	*P*-value
		Control	Injection	Rumen-protected	Water soluble		
pH	30	6.57	6.54	6.41	6.26	0.05	0.189
	60	6.26	6.15	6.12	6.25	0.05	0.761
	P-value[1]	0.238	0.022	0.044	0.973		
NH_3-N (mg/L)	30	186.37[b]	184.11[b]	251.29[a]	227.55[ab]	9.53	0.016
	60	172.50[b]	209.94[ab]	186.09[b]	234.36[a]	7.73	0.011
	P-value	0.401	0.395	0.002	0.579		
Total volatile fatty acids (Mmol/L)	30	85.20	82.80	87.60	84.00	2.54	0.935
	60	90.00	88.80	88.80	86.40	2.33	0.965
	P-value	0.315	0.402	0.158	0.140		

[a-b] Means within the same row with different superscript letters had a significant difference ($P<0.05$).

[1] For comparing sampling days 30 and 60.

جدول ۵- اثر روش‌های مختلف مصرف ویتامین AD_3E و زمان نمونه‌گیری بر جمعیت پروتوزوآی شکمبه بره‌های پرواری

Table 5. Effect of different methods of vitamin AD_3E consumption and sampling time on ruminal protozoa population ($N\times10^5$) of fattening lambs

Protozoa	Treatments (different vitamin administration methods)				Sampling time (day)		SEM	*P*-value		
	Control	Injection	Rumen-protected	Water soluble	30	60		Tr	Time	Tr*Time
Total protoza	103.10[a]	74.10[d]	81.00b[c]	86.60[b]	86.40	83.50	2.19	0.001	0.893	0.591
Entodininnae	100.40[a]	71.60[d]	78.60[bc]	84.70[b]	83.80	86.00	2.20	0.001	0.934	0.658
Ophryoscolecine	0.400	0.700	0.600	0.600	0.750	0.400	0.118	0.858	0.871	0.989
Diplodininane	0.400	0.300	0.600	0.400	0.450	0.400	0.100	0.773	0.810	0.287
Isotrichidae	0.700	0.400	1.00	0.300	0.650	0.55	0.155	0.432	0.761	0.934
Dasitrichidae	1.200	1.100	0.800	0.600	0.750	1.100	0.153	0.526	0.277	0.736

[a-d] Means within the same row with different superscript letters had a significant difference ($P<0.05$).

SEM: Standard error of the means; Tr: Treatment

جدول۶ - تأثیر روش‌های مختلف مصرف ویتامین AD_3E و زمان نمونه‌گیری بر فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری

Table 6. Effect of different methods of vitamin AD_3E consumption on blood parameters of fattening lambs

Blood metabolites	Treatments (different vitamin administration methods)				Sampling time (day)		SEM	*P*-value		
	Control	Injection	Rumen-protected	Water soluble	30	60		Tr	Time	Tr*Time
BUN (mg/dL)	26.72[a]	20.94[b]	23.01[b]	24.07[ab]	22.17	25.22	1.432	0.008	0.010	0.487
Cholesterol (mg/dL)	46.26[b]	57.93[a]	49.37[b]	56.74[a]	54.22	52.93	0.271	0.002	0.016	0.124
Triglyceride (mg/dL)	93.22[ab]	90.60[b]	95.70[ab]	96.04[a]	96.57	91.20	0.899	0.007	0.002	0.0312
Glucose (mg/dL)	88.88	84.53	86.17	84.35	88.64	83.33	1.207	0.501	0.03	0.328
Total protein (g/dL)	7.27	6.90	7.02	6.92	7.08	6.97	0.105	0.609	0.581	0.003
Albumin (g/dL)	2.70	2.97	2.99	2.80	2.75	2.98	0.071	0.386	0.096	0.059
HDL (mg/dL)	33.26[a]	30.65[ab]	29.90[b]	32.04[ab]	31.49	31.43	0.459	0.080	0.952	0.006
LDL (mg/dL)	15.89	17.15	15.13	14..68	15.63	15.79	0.524	0.388	0.880	0.610
MAD (nm/L)	2.63	2.90	2.78	2.82	2.84	2.72	0.078	0.688	0.490	0.330

[a-b] Means within the same row with different superscript letters had a significant difference ($P<0.05$).

SEM: Standard error of the means; Tr: Treatment

جدول ۷- اثر روش‌های مختلف مصرف ویتامین AD_3E بر فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری در روزهای ۳۰ و ۶۰ آزمایش

Table 7. Effect of different methods of vitamin AD_3E consumption on blood parameters of fattening lambs at 30 and 60 days of experiment

Blood metabolites	Sampling time (day)	Treatments (different vitamin administration methods)				SEM	*P*-value
		Control	Injection	Rumen-protected	Water soluble		
BUN (mg/dL)	30	25.73[a]	20.12[b]	19.96[b]	23.03[ab]	1.878	0.051
	60	27.96[a]	21.75[b]	26.06[ab]	25.10[ab]	1.933	0.080
	P-value	0.019	0.540	0.070	0.385		
Cholesterol (mg/dL)	30	45.07[b]	58.11[a]	52.58[ab]	53.13[ab]	1.613	0.023
	60	47.46[b]	57.76[a]	46.17[b]	60.35[a]	2.005	0.009
	P-value	0.712	0.949	0.103	0.009		
Triglyceride (mg/dL)	30	95.83	94.90	96.51	99.06	0.948	0.481
	60	90.60[ab]	86.30[b]	94.89[a]	93.02[ab]	1.28	0.089
	P-value	0.000	0.011	0.535	0.018		
Glucose (mg/dL)	30	88.64	85.51	88.62	90.66	1.464	0.656
	60	83.33	83.55	83.73	78.04	1.759	0.269
	P-value	0.002	0.387	0.007	0.013		
Total protein (g/dL)	30	7.05[ab]	7.50[a]	7.34[ab]	6.45[b]	0.160	0.089
	60	7.48[a]	6.30[b]	6.70[b]	6.45[b]	0.160	0.089
	P-value	0.632	0.004	0.237	0.054		
Albumin (g/dL)	30	2.88	2.68	2.84	2.58	0.087	0.621
	60	2.51[b]	3.27[a]	3.13[ab]	3.02[ab]	0.109	0.062
	P-value	0.109	0.138	0.275	0.140		
HDL (mg/dL)	30	31.35	30.65	32.39	31.58	0.548	0.766
	60	35.16[a]	30.65[bc]	27.41[c]	32.50[ab]	0.841	0.002
	P-value	0.954	0.998	0.048	0.538		
LDL (mg/dL)	30	15.64	16.47	16.29	14.13	0.635	0.590
	60	16.14	17.84	13.97	15.23	0.851	0.464
	P-value	0.864	0.490	0.296	0.665		
MDA (nm/L)	30	2.46	2.92	2.93	3.04	0.107	0.235
	60	2.81	2.88	2.62	2.59	0.115	0.810
	P-value	0.393	0.807	0.369	0.0108		

[a-b] Means within the same row with different superscript letters had a significant difference ($P<0.05$).
SEM: Standard error of the means; Tr: Treatment

انتظار می‌رود با توجه نقش ویتامین و سلنیوم در آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش مرگ سلولی، غلظت مالون دی‌آلدهید در تیمارهای دریافت‌کننده ویتامین، کاهش داشته باشد (Aktas *et al.*, 2011). اثر مکمل‌های سلنیوم-ویتامین توکوفرول و AD_3E بر غلظت مالون دی‌آلدهید گاوهای هلشتاین در شرایط تنش اکسیداتیو و حمل و نقل طولانی، مثبت ارزیابی شده است. شاید بتوان نتیجه گرفت که شرایط نگهداری گوسفندان و سایر شرایط به‌گونه‌ای نبوده که بر میزان مالون دی آلدئید تأثیر بگذارد. بر خلاف بررسی حاضر، در مطالعه Shahbazi *et al*. (2024) روی میش‌ها، استفاده از ویتامین تزریقی AD_3E به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر به‌مدت هفت و ۲۸ روز قبل از زایش، میزان MDA به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که مقادیر توصیه شده انواع ویتامین AD_3E در این بررسی، تأثیری بر عملکرد رشد بره‌ها نداشت. تمام انواع ویتامین مصرفی، شاخص آمونیاک شکمبه را افزایش و اوره خون، جمعیت پروتوزوآ و گاز

تولیدی کل را کاهش داد. تایید تاثیر انواع ویتامین باید با مقادیر بیشتر مورد بررسی مجدد قرار گیرد.

فهرست منابع

Abdelatif, M. A., Ibrahim, Y. M., &Hassan, Y. Y.(2009). Seasonal variation in erythrocytic and leukocytic indices and serum proteins of female Nubian goats. *Journal of Science and Research*, *4*, 168-174.

Abdelhamid, A. M., el-Ayouty, S. A., & Arief, H. S. (1992). Effect of feed intake and dietary vitamin A levels on sheep performance. *Archiv Tierernahr*, *42*(3-4), 325-35. doi: 10.1080/17450399209428546

Aktas, M. S., Ozkanlar, S., Karakoc, A., Akcay, F., Ozkanlar, Y., Elsevier, L. T. D., & Oxford, U. K. (2011). Efficasy of vitamin E+selenium and vitamin A+E+D combination on oxidative stress indused by long term transportation in Holstein dairy cows. *Livestock Science*, *141*, 76-79. doi: 10.1016/j.livsci.2011.04.010

AOAC. (2007). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists (18th Ed.) Gaithersburg, MD. USA.

Arnett, A. M., Dikeman, M. E., Spaeth, C. W., Johnson B. J., & Hildabrand, B. (2007). Effects of vitamin A supplementation in young lambs on performance, serum lipid, and longissimus muscle lipid composition. *Journal of Animal Science*, *85*(11), 3062-3071. doi: 10.2527/jas.2007-0176

Asadian, A., Mezes, M., & Mirhadi, S. A. (1996). Effect of vitamins A and E on blood plasma vitamin status and daily body mass gain of different fat-tailed sheep breeds. *Acta Veterinaira Hungarica*, *44*(1), 99-109.

Astawa, P. A., Partama, I. B. G., Suyadnya, P., & Sutarpa, I. N. S. (2011). Effect of vitamin-mineral supplementation in commercial feed on the digestibility coefficient and rumen fermentation of Bali cattle. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, *36*(1), 69-74. doi: 10.14710/jitaa.36,1.69-74

Barnet, A. J. G., & Reid, R. L. (1957). Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen. I. The volatile fatty acid Production of fresh grass. *Journal of Agriculture Science*, *48*, 315-321.

Berthelot, V. L. Broudiscou., L., & Schmidely, P. (2014). Effect of vitamin E supplementation on fatty acid composition of muscle and adipose tissues of indoor lambs with special attention on rumen-derived trans monounsaturated fatty acids. *Meat Science*, *96*(3), 1281-1288. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.10.026

Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plantderived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, *145*, 209-228. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014

Bonet M. L., Ribot J., Felipe F., & Palou A. (2003). Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *60*(7), 1311-1321. doi: 10.1007/s00018-003-2290-x

Broderick, G. A., & Kang J. H. (1980). Automated simultaneous determinations of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal Dairy Science*, *63*, 64-75. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8

Daniels, J. T., Hatfield, P. G., Burgess, D. E., Kottt, R. W., & Bowman, J. G.(2000). Evaluation of ewe and lamb immune response when ewes were supplemented with vitamin E. *Journal of Animal Science*, *78*(10), 2731-2736. doi: 10.2527/2000.78102731x.

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

El Hadi, H., Vettor, R., & Rossato, M. (2018). Vitamin E as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease: Reality or myth? *Antioxidants*, *7*, 12-25. doi: 10.3390/antiox7010012

Ellis, J., Kebreab, E., Odongo, N., McBride, B., Okine, E., & France, J. (2007). Prediction of methane production from dairy and beef cattle. *Journal of Dairy Science*, *90*, 3456-3466. doi: 10.3168/jds.2006-675

Freund, C., & Gotthardt, D. N. (2017). Vitamin A deficiency in chronic cholestatic liver disease: Is vitamin A therapy beneficial? *Liver International*, *37*, 1752-1758. doi: 10.1111/liv.13433

Getachew, G., Makkar, H., & 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. doi: 10.1017/S0021859602002393

Ghorbani, A., NooriyanSoroor, M. E., & Moeini, M. M.(2017). The effect of organic zinc and selenium supplementation on feed intake, digestibility, and rumen fermentation parameters in sheep. *Animal Sciences Journal*, *30*(115),17-36. doi: 10.22092/asj.2017.113262 [In Persian]

Gorocica-Buenfil, M. A., Fluharty, F. L., Bohn, T., Schwartz, S. J., & Loerch S. C. (2007). Effect of low vitamin A diets with high-moisture or dry corn on marbling and adipose tissue fatty acid composition of beef steers. *Journal of Animal Science*, *85*(12), 3355-3366. doi: 10.2527/jas.2007-0172

Guo, X., Cheng, L., Liu, J., Zhang, S., Sun, X., & Al-Marashdeh, O. (2019). Effects of licorice extract supplementation on feed intake, digestion, rumen function, blood indices and live weight gain of karakul sheep. *Animal*, *9*(5), 279. doi: 10.3390/ani9050279

Habeeb, A. A. M., Saleh, H. M., & EL-Tarabany, A. A. (2017). Effect of yeast on ruminal function of farm animals: a review. *Merit Research Journal of Agricultural Science and Soil Sciences*, *5*, 80-88.

Habibian, M., Ghazi, S., Moeini, M. M., & Abdolmohammadi, A. (2014). Effects of dietary selenium and vitamin E on immune response and biological blood parameters of broilers reared under thermoneutral or heat stress conditions. *International Journal of Biometeorology*, *58*(5), 741-752. doi: 10.1007/s00484-013-0654-y

Hafez, Y. M. (2012). Enhancing milk production in periparturient buffalo fed protected fat with and without vitamin AD3E treatment. *Egyptian Journal of Animal Production*, *49*(3), 249-256.

Hernández-Mendo, O., Ramírez-Mella, M., Ramírez-Bribiesca, J. E., Crosby-Galván M. M., & Burgueño-Ferreira J. A. (2017). Effect of vitamin E on ruminal fermentation and nutrient digestion in steers supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid. *Animal Nutrition and Feed Technology*, *17*(2), 293-301. doi: 10.5958/0974-181X.2017.00028.2

Hino, T., Andoh, N., & Ohgi, H. (1993). Effects of β-carotene and α-tocopherol on rumen bacteria in the utilization of long chain fatty acids and cellulose. *Journal of Dairy Science*, *76*, 600-605. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77380-4

Karges, K., Brooks, J. C., Gill, D. R., Breazile, J. E., Owens,F. N., & Morgan, J. B. (2001). Effects of supplemental vitamin D3 on feed intake, carcass characteristics, tenderness, and muscle properties of beef steers. *Journal of Animal Science*, *79*(11), 2844-2850. doi: 10.2527/2001.79112844x

Karges, K., Owens, F. N., Gill, D. R., & Morgan, J. B. (1999). Effects of supplemental vitamin D levels on feed intake and blood minerals of yearling steers. Animal Science Research Report. Department of Animal Science, Oklahoma State University, USA. Pp. 1-9.

Kasapidou, E., Wood, J. D., Richardson, I., & Sincla, L. (2012). Effect of vitamin E supplementation and diet on fatty acid composition and on meat colour and lipid oxidation of lamb leg steaks displayed in modified atmosphere packs. *Meat Science*, *90*(4), 908-916. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.11.031

Leedle, R. A., Leedlet, Jane, A. Z., & Butines, M. D. (1993). Vitamin E is not degraded by ruminal microorganisms: Assessment with ruminal contents from a steer fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*, *71*, 3442-3450. doi: 10.2527/1993.71123442x

Macit, M., Aksakal, V., Emsen, E., Aksu, M. I., Karaoglu, M., & Esenbuga, N. (2003). Effects of vitamin E supplementation on performance and meat quality traits of Morkaraman male lambs. *Meat Science*, *63*(1), 51-55. doi: 10.1016/S0309-1740(02)00052-9

Menke, K. H., & 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.

Mcintosh, F. Williams, P. Losa, R. Wallace, R. Beever, D., & Newbold, C. (2003) Effects of essential oils on ruminal metabolism and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 5011-5014. doi: 10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003

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

Ogimoto, K., & Imai, S. (1981). Atlas of Rumen Microbiology. the University of Wisconsin - Madison Japan Scientific Societies Press. P. 231.

Pop, T. L., Sîrbe, C., Benta, G., Mititelu, A., & Grama, A. (2022). The role of vitamin D and vitamin D binding protein in chronic liver diseases. *International Journal of Molecular Science*, *23*, 10705. doi: 10.3390/ijms231810705

Rode, L. M., McAllister, T. A., & Cheng, K. J. (1990). Microbial degradation of vitamin A in rumen fluid from steers fed concentrate, hay or straw diets. *Canadian Journal of Animal Science*, *70*(1), 227-233. doi: 10.4141/cjas90-026

Shahbazi, F., Fatahnia, F., Shamsollahi, M., Jafari, H., & Mohammadi, Y. (2024). Effect of time and amount of vitamin AD3E injection in late pregnancy on colostrum quality, concentration of plasma parameters, and antioxidant status of Afshari ewes and their lambs. *Animal Production Research*, *13*(1), 49-67. doi: 10.22124/ar.2024.26232.1807 [In Persian]

Sharokhian Rezaee, M., Riasi, A., Ansari Mahyari, S., Khorvash, M., & Khorsandi, S. (2015). Effect GnRH, hCG and AD3E injection on reproductive performance and blood metabolites and progesterone of high producing dairy cows in summer season. *Animal Science Research*, *25*(2), 97-107. [In Persian]

Tagliapietra, F., Cattani M., Hansen, H. H., Bittante, G., & Schiavon, S. (2013). High doses of vitamin E and vitamin C influence in vitro rumen microbial activity. *Animal Feed Science and Technology*, *183*, 210-214. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.05.010

Wei, C., Lin S. X., Wu, J. L., Zhao, G. Y., Zhang, T. T., & Zheng, W. S. (2015). Effects of supplementing vitamin E on in vitro rumen gas production, volatile fatty acid production, dry matter disappearance rate, and utilizable crude protein. *Czech Journal of Animal Science*, *60*(8), 335-341. doi: 10.17221/8402-CJAS