

استفاده از پوست انار و پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری تولیدکننده آنزیم تاناز بر هیستومورفومتری و هیستوپاتولوژی شکمبه، کبد و کلیه‌ها در بره‌های پرواری

زهرآ جهان‌آرا^۱، مرتضی چاجی^{۲*}، امید خراسانی^۳ و فرشاد باغبان^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۳۰

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

^۲ استاد گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

^۳ دکتری تغذیه دام، هنرستان خوارزمی دزفول

^۴ استادیار گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج

*مسئول مکاتبه: Email: chaji@asnrukh.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: هضم و جذب با رشد و توسعه‌ی پرزهای دستگاه گوارش در ارتباط می‌باشد و یکی از مهمترین عوامل موثر بر رشد بافت پوششی شکمبه، جیره غذایی می‌باشد هدف: پژوهش حاضر با هدف بررسی استفاده از پوست انار و پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری تولیدکننده تاناز (*Klebsiella pneumoniae*) بر هیستومورفومتری و هیستوپاتولوژی بافت شکمبه-نگاری، کبد و کلیه‌های بره‌های پرواری انجام شد. روش کار: در آزمایش حاضر از ۱۵ رأس بره نر عربی ۹ یا ۱۰ ماهه با وزن $7/91 \pm 39/75$ کیلوگرم در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ۵ تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- جیره‌ی شاهد (فاقد پوست انار) ۲- جیره شاهد + ۲۰ درصد پوست انار، ۳- جیره شاهد + ۲۰ درصد پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بودند. پس از کشتار دام‌ها، جهت مطالعات بافت‌شناسی، از بافت بخش‌های مختلف دستگاه گوارش قطعاتی جدا و به‌طور جداگانه در ظروف درب بسته حاوی فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. **نتایج:** ضخامت بافت پوششی و ضخامت پرز در شکمبه و نگاری در تیمار حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری از سایر تیمارها کمتر بود ($P < 0/05$)؛ اما بین تیمار حاوی پوست انار عمل‌آوری نشده و شاهد اختلافی وجود نداشت ($P > 0/05$). ارتفاع پرز و عمق پرز شکمبه در تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیشتر بود ($P < 0/05$) و در تیمار حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری کمترین مقدار بود. در تمام مقاطع کبدی یافته‌های هیستوپاتولوژیک مشابهی مشاهده شد. در تیمار عمل‌آوری شده با باکتری از شدت کست‌های بازوفیلیک کلیوی نسبت به تیمار پوست انار کاسته شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** در مقایسه با تیمارهای شاهد و حاوی پوست انار، تیمار پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* باعث بهبود وضعیت شاخص‌های بافتی شکمبه-نگاری و کاهش نسبی ضایعات بافتی شکمبه و شدت کست‌های بازوفیلیک در کلیه‌ها نسبت به تیمار پوست انار شد. بنابراین، می‌توان استفاده از باکتری *کلبسیلا پنومونیه* را در مصرف خوارک‌های حاوی تانن توصیه کرد.

واژگان کلیدی: بافت، پرز، تانن، سلول‌های التهابی، هایپرکراتوز، نگاری

مقدمه

بافت پوششی شکمبه نقش مهمی را در حفظ شرایط پایدار شکمبه‌ای بر عهده دارد، به طوری که تغییر در جذب محصولات نهایی تخمیر موجب تغییر اسمولاریته و در نهایت کاهش هضم میکروبی در شکمبه می‌شود (فروتوس و همکاران ۲۰۰۴). بنابراین توسعه و نمو مطلوب سلول‌های بافت پوششی دیواره شکمبه برای استفاده از مواد مغذی ضروری است (ونگ و همکاران ۲۰۰۹). بافت پوششی شکمبه مسئول اغلب فعالیت‌های مهم فیزیولوژیکی از جمله هضم، جذب، انتقال مواد مغذی، متابولیسم اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و باز چرخ آورده است (اسچنباچ و همکاران ۲۰۰۲).

هضم و جذب در ارتباط با رشد و توسعه‌ی پرزهای شکمبه و پرزهای روده می‌باشد و یکی از مهمترین عوامل موثر بر رشد بافت پوششی شکمبه، جیره غذایی می‌باشد و افزایش در ارتفاع پرز و سطح پرز ظرفیت جذب را افزایش می‌دهد و به پایداری pH شکمبه کمک می‌کند (ونگ و همکاران ۲۰۰۹). سلول‌های بافت پوششی نقش مهمی را در حفظ شرایط پایدار شکمبه‌ای بر عهده دارند و تغییر در مرفولوژی ممکن است زمینه ساز اختلال در اعمال این بافت‌ها باشد (خراسانی و همکاران ۲۰۲۱). بنابراین توسعه و نمو مطلوب سلول‌های بافت پوششی دیواره شکمبه برای استفاده از مواد مغذی ضروری است (ونگ و همکاران ۲۰۰۹).

پوست انار یکی از محصولات فرعی کارخانه‌های آب میوه گیری در ایران می‌باشد که میزان تولید سالانه آن در حدود ۱۲۲ هزار تن است (مک سوینی و همکاران ۲۰۰۱). این پسمانده حاوی مقادیر زیادی متابولیت‌های ثانویه مانند تانن، ساپونین و ترکیبات پلی فنولیک با خواص متنوعی از قبیل اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و تحریک کنندگی سیستم ایمنی هستند (آدامز و همکاران ۲۰۰۶). پوست انار حاوی ۲۲۸۳/۷۷ میلی‌گرم در صد گرم اکزالات، ۲۶/۹۶ میلی‌گرم در صد گرم سیانید هیدروژن، ۶/۵ درصد آلکالوئید و ۱/۳۳ درصد فیتات

می‌باشد (رومل و همکاران ۲۰۱۶). تانن‌ها بسته به غلظت و ماهیت آن‌ها، گونه‌های حیوانی، وضعیت فیزیولوژیکی حیوان و ترکیب جیره دارای اثرات مفید و مضر می‌باشند (مکار ۲۰۰۰). تانن‌های قابل هیدرولیز معمولاً توسط آنزیم‌های میکروفلورای شکمبه تجزیه می‌شوند، اما تانن‌های متراکم بسیار گسترده هستند و نسبت به تانن‌های قابل هیدرولیز کمتر مستعد هیدرولیز می‌باشند (کهن و شلتون ۱۹۹۷). عمده‌ترین ویژگی تانن‌ها باند شدن با پروتئین‌ها می‌باشد که باعث ممانعت از اثر آنزیم‌ها می‌شود، با افزایش تانن، قابلیت هضم پروتئین‌ها کاهش می‌یابد. تانن‌ها می‌توانند سبب ممانعت از فعالیت میکروب‌ها شده و باعث عدم فعالیت اندوگلوکوناز خارج سلولی در برخی باکتری‌های هضم کننده فیبر شوند (بابادی و همکاران ۲۰۱۸). تانن‌ها از هضم مواد لیگنوسلولزی که وابسته به آنزیم‌های خارج سلولی است جلوگیری کرده مانع اتصال میکروب‌ها به ذرات غذایی و کاهش قابلیت هضم آن‌ها و ماندگاری بیشتر آن‌ها در شکمبه می‌شوند (مک سوینی و همکاران ۲۰۰۱). مک سوینی و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که تانن‌ها می‌توانند هضم الیاف را از طریق تشکیل کمپلکس با بخش لیگنوسلولزی و کاهش اتصال آن‌ها با میکروارگانیسم‌ها و یا مهار مستقیم میکروارگانیسم‌ها کاهش دهند. در واقع به دلیل اتصال تانن‌ها به مولکول‌های بزرگ مثل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌های ساختمانی و نشاسته، دسترسی فلور میکروبی شکمبه به آن‌ها کاهش یافته و باعث کاهش تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای آن‌ها می‌شود (مک سوینی و همکاران ۲۰۰۱). از طرفی کاهش pH با مصرف گیاهان حاوی تانن احتمالاً فعالیت باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها تجزیه کننده سلولز در شکمبه را محدود کرده و قابلیت هضم الیاف خام و انرژی قابل متابولیسم را کاهش می‌دهد (خفی پور و همکاران ۲۰۰۹). پژوهشگران بیان کرده‌اند که در شرایط درون تنی، کاهش جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه در اثر حضور تانن، عامل اصلی کاهش pH شکمبه است و کاهش pH به

گونه‌های باکتریایی از جمله کلبسیلا پنومونیه وجود دارد که به تولید تاناز معروف است و تاناز تولیدی توسط کلبسیلا پنومونیه در محدوده pH اسیدی ۴/۵ تا ۵/۵ ثابت بالاتری دارد. بر این اساس تاناز حاصل از باکتری کلبسیلا پنومونیه به دلیل طبیعت اسیدوفیلیک و پایداری حرارتی، برای کاربردهای مختلف صنعتی از ارزش بالایی برخوردار است (کومار و همکاران ۲۰۱۵). چندین محقق گزارش کردند که سویه‌های کلبسیلا پنومونیه قادر به تجزیه ترکیبات فنلی هستند؛ در واقع با استفاده از باکتری می‌توان با تغییر، تخریب و غیرفعال شدن تانن، بر تانن غلبه کرد؛ در این میان برخی از حیوانات از طریق وجود میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده تانن با تانن سازگار شده‌اند و این جدایه‌ها احتمالاً با تغییر pH و کاهش اثرات سمی تانن، فعالیت پکتیناز و سلولاز را افزایش می‌دهند؛ در واقع کاهش فنل‌ها و تانن‌ها باعث افزایش قابلیت هضم توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه می‌شود. بنابراین، در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری، عمل‌آوری برگ درختان غنی از تانن با تاناز در سیستم‌های تغذیه حیوانات بسیار مهم است (محمد آبادی و همکاران ۲۰۲۰). در مجموع، از جمله پیامدهای مضر درصد بالای تانن در رژیم غذایی نشخوارکنندگان کاهش مصرف خوراک، تاثیر منفی بر فعالیت باکتری‌های شکمبه، کاهش کارایی آنزیم‌های گوارشی، کاهش دسترسی به مواد مغذی و در نهایت کاهش رشد و تولید حیوانات می‌باشد (فروتوس و همکاران ۲۰۰۴). لذا، در آزمایش حاضر تاثیر استفاده‌ی یکی از عوامل تجزیه‌کننده‌ی تانن یعنی باکتری کلبسیلا پنومونیه تولید‌کننده تاناز مورد بررسی و توجه قرار گرفت بنابراین، آزمایش حاضر با هدف بررسی تاثیر تغذیه‌ی پوست انار به عنوان یک منبع دارای تانن که با باکتری کلبسیلا پنومونیه عمل‌آوری شده؛ بر هیستومورفومتري و هیستوپاتولوژی شکمبه -نگاری، کبد و کلیه‌های بره‌های پرواری انجام شد.

وسيله‌ی ساپونین و تانن در مطالعات دیگران نیز مشاهده شده است (چاشنی دل و همکاران ۲۰۱۹). در آزمایشی در گوسفند، هنگامی که مقدار غلاف لئوکانا به ۵۰ درصد از کل مصرف افزایش یافت، غلظت تانن‌های متراکم شده در رژیم غذایی، تجزیه‌ی اجزای تشکیل‌دهنده دیواره سلولی، تولید اسیدهای چرب فرار و فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده الیاف در شکمبه را کاهش داد (نگوا و همکاران ۲۰۰۳). در پژوهشی طی بررسی اثرات سطوح مختلف تانن (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در کیلوگرم) بر واکنش‌های بافتی دستگاه گوارش در بز مشخص شد که افزایش تانن درجیره‌ی غذایی با واکنش‌های منفی در بافت دستگاه گوارش، شامل افزایش کراتینه شدن و ضخیم شدن بافت پوششی شکمبه، نگاری، هزارلا و شیردان همراه بوده و این تغییرات بافتی در سطوح بالا در پیش‌مده، ممکن است فرآیندهای هضمی را به خطر انداخته و با کاهش عملکرد ترش‌های شیردان، هضم پروتئین‌ها مختل شود (امبسا و همکاران ۲۰۰۲). فرض بر این است که افزایش محتوای تانن در رژیم غذایی ممکن است منجر به آسیب متغیر بافت اپیتلیال دستگاه گوارش و در نتیجه کاهش جذب مواد مغذی شود (امبسا و همکاران ۲۰۰۲). تلاش‌های گسترده‌ای برای شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که ممکن است مجموعه تانن و یا پروتئین تانن را تخریب کنند، انجام شده است، اما در مورد اثر تانن و گیاهان دارای تانن بر بافت پوششی دستگاه گوارش اطلاعات کمی در دست است (امبسا و همکاران ۲۰۰۲). تاناز کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی، داروسازی و صنایع شیمیایی دارد؛ از جمله تولید اسید گالیک علاوه بر این، تاناز در شفاف‌سازی آب میوه‌ها و تولید خوراک دام استفاده می‌شود (چاوز گونزالز و همکاران ۲۰۱۲). باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای قادر به تولید تاناز هستند در این میان سرعت رشد باکتری‌ها بسیار زیاد است، علاوه بر این، تاناز باکتریایی می‌تواند تانن‌های طبیعی و اسید تانیک را به طور مؤثر تجزیه و هیدرولیز کند (کومار و همکاران ۲۰۱۵). گزارشات زیادی در مورد

مواد و روش‌ها

آزمایش حاضر در مزرعه آموزشی-پژوهشی و آزمایشگاه‌های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. در این آزمایش از ۱۵ راس بره‌ی نر عربی ۹ یا ۱۰ ماهه با وزن اولیه‌ی $7/91 \pm 39/75$ کیلوگرم استفاده شد. طول دوره آزمایش ۳۵ روز شامل ۱۴ روز دوره‌ی عادت پذیری و ۲۱ روز رکورد برداری و آزمایش بود. قبل از آغاز پژوهش همه‌ی بره‌ها برای انگل‌های بیرونی (یک میلی لیتر آزانтол ۱۰ درصد در هفت لیتر آب به روش اسپری؛ شرکت بایر آلمان) و انگل‌های داخلی (تریکل ابدانول با لوامیزل، ۱۲ میلی لیتر برای هر گوسفند؛ شرکت دارو پخش ایران) و برای مقابله با انتروتوکسمی (سه میلی لیتر برای هر بره، موسسه‌ی

تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی-ایران) واکسینه شدند و دام‌ها در قفس‌های متابولیکی ($1/2m \times 1/4$) نگهداری شدند. بره‌ها به صورت تصادفی به یکی از سه تیمار شامل ۱- شاهد (جیره‌ی فاقد پوست انار)، ۲- جیره شاهد + ۲۰ درصد پوست انار، ۳- جیره شاهد + ۲۰ درصد پوست انار عمل آوری شده با باکتری کلبسیلا پنومونیه تولید کننده تاناز ($ATCC^{\circledR} 35657^{TM}$) اختصاص یافتند. شرایط تغذیه و مدیریت پرورش بره‌های انتخاب شده قبل از آزمایش یکسان بود. جیره‌ی بره‌ها با استفاده از جدول احتیاجات مواد مغذی نشخوارکنندگان کوچک (NRC 2007) تنظیم شدند و به صورت کاملاً مخلوط در دو نوبت (ساعت هشت و شانزده) در حد اشتها به همراه دسترسی آزاد به آب در اختیار بره‌ها قرار گرفت (جدول ۱).

Table 1- Feed ingredients and chemical composition of the experimental diets fed to lambs

| Ingredients Percentage | Control | No processing | By processing |
|--|---------|---------------|---------------|
| Alfalfa hay | 15.0 | 15.0 | 15.0 |
| Wheat straw | 25 | 25 | 25 |
| Barley grain | 20 | 20 | 20 |
| Corn grain | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Soybeans meal | 5 | 15 | 15 |
| Wheat bran | 30 | 0 | 0 |
| pomegranate peel | 0 | 20 | 20 |
| Salt | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Vitamin and mineral supplements ^a | 1 | 1 | 1 |
| Chemical composition Percentage | | | |
| Organic matter | 94 | 93 | 93 |
| Crude protein | 13.2725 | 12.9225 | 12.9225 |
| NDF ^b | 36.96 | 38.58 | 38.55 |
| ADF ^c | 31.50 | 27.06 | 23.16 |
| ME ^d (Mcal/kg DM) | 2.442 | 2.439 | 2.439 |

^a Premix contained (per kg): Vitamin A, 500,000 IU/mg; vitamin D₃, 100000 IU/mg; vitamin E, 100 mg/kg; Ca, 180 g/kg; P, 60000 mg/kg; Na, 60000 mg/kg; Mg, 19000 mg/kg; Zn, 3000 mg/kg; Fe, 3000 mg/kg; Mn, 19000 mg/kg; Cu, 300 mg/kg; Co, 100 mg/kg; Se, 1 mg/kg; I, 100 mg/kg; antioxidant, 400 mg/kg; carrier, up to 1000 g.

^bNDF, neutral detergent fibre.

^c ADF, acid detergent fibre.

^d Calculated from each feed ingredients.

^{۱۰۷})؛ قرار داده شدند و بلافاصله به کیسه‌های پلاستیکی ده کیلویی منتقل و جهت بی‌هوازی شدن محیط، درب آن‌ها بسته و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند که پس از خارج شدن از کیسه‌ها، خشک و آسیاب شدند و به صورت مخلوط با جیره به بره‌ها داده

پوست انار از شهرستان باغملک - استان خوزستان تهیه و در هوای آزاد و سایه خشک و آسیاب شدند. جهت عمل آوری پوست انار پس از تبدیل آن‌ها به قطعات ۳-۴ سانتی‌متری، در ۱۰ لیتر آب مقطر حاوی ۱ لیتر محلول نوترینت براث حاوی باکتری کلبسیلا پنومونیه (cfu/ml)

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ۵ تکرار انجام شد. همه‌ی داده‌ها با نرم افزار آماری SAS (نسخه‌ی ۹/۴) با مدل خطی GLM مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ درصد انجام گرفت. از مدل آماری زیر استفاده شده است:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

که در این مدل، Y_{ij} مقدار مشاهده شده، μ میانگین جامعه، T_i اثر تیمار i ام، ε_{ij} اثرات خطای آزمون است.

نتایج و بحث

هیستومورفومتري شکمبه و نگاری

تاثیر تیمارهای آزمایشی شامل پوست انار و پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری کلبسیلا پنومونیه تولید کننده تاناز بر ساختار هیستومورفومتري شکمبه و نگاری در جدول ۲ آمده است. ضخامت بافت پوششی و ضخامت پرز در نگاری در تیمار حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری از سایر تیمارها کمتر بود ($P < 0/05$). بین سایر شاخص‌های نگاری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. ارتفاع و عمق پرز نگاری به طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت؛ اما در تیمار حاوی پوست انار عمل‌آوری نشده بیشتر از سایر تیمارها بود. ضخامت بافت پوششی و ضخامت پرز در شکمبه در تیمار حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری از سایر تیمارها کمتر بود و نسبت به تیمار حاوی پوست انار معنی‌دار بود ($P < 0/05$). ارتفاع پرز و عمق پرز شکمبه در تیمار شاهد به طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیشتر بود ($P < 0/05$) و این اختلاف نسبت به تیمار حاوی باکتری بیشتر بود. در سایر شاخص‌های شکمبه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

شدند (محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۱). باتوجه به اینکه این باکتری اسپور متحرک ندارد از طریق هوا جابجا نمی‌شود، لذا برای کاربرد و دام مشکلی ایجاد نخواهد کرد. از طرفی عمل‌آوری و تهیه‌ی سیلاژ در محیط محلول انجام شده است که جابجایی با هوا منتفی خواهد بود. در هنگام مصرف خوراک عمل‌آوری شده نیز باکتری‌ها در pH شکمبه از بین می‌روند یا لااقل، غیر فعال می‌شوند (محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۱؛ میتریا و ودنار، ۲۰۱۹) در پایان آزمایش بره‌های هر تیمار پس از ۱۶ ساعت گرسنگی و دسترسی آزاد به آب به طور شرعی و آسان کشتار شدند. سپس، بلافاصله محوطه‌ی شکمی باز و دستگاه گوارش از ناحیه‌ی مری تا انتهای کولون جدا و خارج شد. پس از شستشوی شکمبه و نگاری با آب مقطر، قسمت‌هایی در حدود یک سانتی متر مربع از ناحیه‌ی شکمی شکمبه و نگاری و نمونه‌هایی به ابعاد ۱ سانتی‌متر مکعب از کبد و کلیه تیمارهای مورد آزمایش جدا شد و هر نمونه به طور جداگانه در محلول ۱۰ درصد فرمالین خنثی تثبیت شد (خراسانی و همکاران ۲۰۲۱). پس از ۲۴ ساعت فرمالین ظروف تعویض شد و نمونه‌ها جهت بررسی هیستومورفومتري و تغییرات بافتی به مرکز پاتولوژی دامپزشکی اصفهان منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌های بافتی با استفاده از قالب‌های لوک هارت به صورت عرضی در پارافین قالب‌گیری و با کمک میکروتوم چرخان مقطعی به ضخامت پنج میکرومتر تهیه و با استفاده از هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شدند (خراسانی و همکاران ۲۰۲۱) و تغییرات بافتی با میکروسکوپ Nikon (مدل YS100 ساخت ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری شاخص‌های مورد مطالعه در بزرگ‌نمایی‌های مختلف با عدسی‌های مدرج و کالیبره شده، انجام شد. مطالعات میکرومتري شامل ارتفاع، ضخامت، عمق پرز، ضخامت بافت پوششی، ضخامت لایه‌ی عضلانی و ضخامت کل دیواره‌ی شکمبه و نگاری مورد بررسی هیستومورفومتري قرار گرفت.

Table 2- The effect of experimental diets on histomorphometry of rumen and reticulum tissues

| Variables | treatment | | | SEM | P-value |
|--------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------------|---------|---------|
| | Control | pomegranate peel | Processed pomegranate peel | | |
| Reticulum | | | | | |
| Wall thickness | 2450.0 | 2097.9 | 2527.5 | 96.283 | 0.1429 |
| Thickness of tunica muscularis | 2281.3 | 2062.5 | 2397.9 | 81.265 | 0.2363 |
| Thickness epithelial tissue | 88.333 ^a | 79.167 ^a | 57.500 ^b | 3.893 | 0.0019 |
| Papillae depth | 1175.0 | 1312.5 | 1143.8 | 90.047 | 0.7295 |
| Papillae thickness | 329.17 ^a | 272.50 ^a | 173.33 ^b | 19.088 | 0.0015 |
| Papillae height | 1375.0 | 1502.1 | 1300.0 | 90.774 | 0.6684 |
| Rumen | | | | | |
| Wall thickness | 1200.4 | 1244.3 | 1366.6 | 42.146 | 0.1109 |
| Thickness of tunica muscularis | 1137.5 | 1223.6 | 1268.8 | 41.762 | 0.3847 |
| Thickness epithelial tissue | 140.71 ^{ab} | 155.00 ^a | 117.14 ^b | 5.930 | 0.0271 |
| Papillae depth | 2398.2 ^a | 1615.4 ^b | 1446.1 ^b | 110.674 | 0.0003 |
| Papillae thickness | 412.50 ^{ab} | 460.71 ^a | 371.42 ^b | 17.169 | 0.0027 |
| Papillae height | 2770.0 ^a | 1973.2 ^b | 1817.9 ^b | 105.681 | <0.0001 |

SEM= standard error of means

^{a,b} Means with different superscripts in the same row differ significantly (P < 0.05).

بره‌های پرواری، افزایش فعالیت باکتری‌های سلولاییتیک و افزایش تولید استات را عامل کاهش ضخامت بافت پوششی و ضخامت پرز گزارش کردند (خراسانی و همکاران ۲۰۲۱). بنابراین در تیمار حاوی پوست انار به علت کاهش هضم‌پذیری مواد مغذی از جمله مواد سلولزی و کاهش فعالیت باکتری‌های سلولاییتیک در شکمبه، شاهد افزایش ضخامت بافت پوششی و ضخامت پرز نسبت به تیمار حاوی پوست انار عمل آوری شده با تاناز باکتریایی هستیم، زیرا تاناز باکتریایی باعث کاهش تانن و در واقع افزایش فعالیت باکتری‌های سلولاییتیک و افزایش تولید استات می‌شود (محمدآبادی و همکاران ۲۰۲۰). افزایش عددی ارتفاع پرز و عمق پرز در تیمار حاوی پوست انار را نیز می‌توان به نقش مهارکنندگی تانن بر باکتری‌های سلولاییتیک و کاهش تولید استات نسبت داد (خراسانی و همکاران ۲۰۲۱ و آریزا و همکاران ۲۰۰۱).

مقدار الیاف قابل حل در شوینده‌ی خنثی (NDS) سبوس گندم ۳۵/۳۸ درصد ماده خشک گزارش شده است (پیکورنل بن‌دیا و همکاران ۲۰۱۶) همچنین میزان پکتین که بخش مهمی از الیاف قابل حل در شوینده‌ی خنثی می‌باشد

در آزمایش حاضر ضخامت بافت پوششی، ضخامت پرز، ارتفاع پرز و عمق پرز شکمبه - نگاری در تیمارهای شاهد و تیمار حاوی پوست انار از تیمار حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با تاناز باکتریایی بیشتر شد. تانن‌ها از هضم مواد لیگنوسلولزی که وابسته به آنزیم‌های خارج سلولی است جلوگیری کرده؛ مانع اتصال میکروب‌ها به ذرات غذایی و کاهش قابلیت هضم آنها و در نتیجه افزایش ماندگاری بیشتر آنها در شکمبه می‌شوند (مک سوینی و همکاران ۲۰۰۱) همچنین گزارش شده است که تانن متراکم باعث ایجاد تغییراتی در مورفولوژی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز می‌شود (جونز و همکاران ۱۹۹۴) و آنزیم‌های میکروبی که مسئول تخریب مواد تشکیل دهنده دیواره سلولی هستند را غیرفعال کرده و باعث رسوب آنها می‌شود (لوهان و همکاران ۱۹۸۱) از طرفی تانن‌ها به کربوهیدرات‌های زنجیر بلند (سلولز و همی‌سلولز) متصل می‌شوند و ترکیبات غیر قابل تجزیه شکمبه را تشکیل می‌دهند و از فعالیت اندوگلوکوناز جلوگیری می‌کنند (بابادی و همکاران ۲۰۱۸). در آزمایشی با مصرف عوامل تنظیم‌کننده‌ی pH در جیره‌های با کنسانتره بالا در

در چغندر قند و سبوس گندم به میزان فراوانی یافت می‌شود (نقوی و همکاران ۲۰۱۲). بر این اساس در پژوهشی با جایگزینی تفاله‌ی چغندر قند بجای نشاسته جو در بره‌های پرواری، جیره‌های حاوی تفاله‌ی چغندر قند که الیاف قابل حل در شوینده‌ی خنثی (NDS) بیشتری داشتند، موجب افزایش ارتفاع و ضخامت پرز و همچنین افزایش ضخامت بافت پوششی شکمبه و نگاری شد (اسدالهی و همکاران ۲۰۱۸). بنابراین، افزایش ارتفاع و ضخامت پرز و همچنین افزایش ضخامت بافت پوششی در تیمار شاهد را می‌توان به میزان الیاف قابل حل در شوینده‌ی خنثی و پکتین بالای موجود در سبوس گندم نیز نسبت داد.

طی بررسی اثرات سطوح مختلف تانن بر واکنش‌های بافتی دستگاه گوارش در بز، افزایش تانن در جیره‌ی غذایی با واکنش‌های منفی در بافت دستگاه گوارش، شامل افزایش کراتینه شدن و ضخیم شدن بافت پوششی شکمبه، نگاری، هزارلا و شیردان همراه بوده است (امبسا و همکاران ۲۰۰۲) همچنین با مصرف گیاه شاهدانه به عنوان یک منبع حاوی تانن در بره‌های پرواری، افزایش ضخامت پرز شکمبه گزارش شد (جین و همکاران ۲۰۱۸) که با نتایج آزمایش حاضر در افزایش ضخامت بافت پوششی و ضخامت پرز در شکمبه - نگاری در تیمار حاوی پوست انار مطابقت دارد و کاهش این پارامترها در تیمار حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری تولید‌کننده تاناز تایید کننده‌ی این موضوع است.

ارتفاع پرزهای نگاری در تیمار حاوی پوست انار به صورت عددی بیشتر از سایر تیمارهای بود. از آنجایی که جذب اسیدهای چرب فرار در شکمبه در اثر افزایش تانن

خوراک کاهش می‌یابد (شریفی و همکاران ۲۰۱۸)، بنابراین در مرحله‌ی نشخوار، اسیدهای چرب فرار بیشتری وارد نگاری می‌شوند و باعث افزایش ارتفاع پرز در این تیمار می‌شوند و کاهش ارتفاع پرز در تیمار حاوی پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری تایید کننده‌ی این موضوع است. به طور کلی گرچه تلاش‌های گسترده‌ای برای شناسایی میکروارگانیزم‌هایی که ممکن است مجموعه تانن و یا پروتئین تانن را تخریب کنند، انجام شده است، اما در مورد اثر تانن بر بافت پوششی دستگاه گوارش اطلاعات کمی در دست است (امبسا و همکاران ۲۰۰۲) و فرض بر این است که افزایش محتوای تانن در رژیم غذایی ممکن است موجب آسیب‌های متغیر بافت پوششی در امتداد دستگاه گوارش و در نتیجه کاهش جذب مواد مغذی شود (امبسا و همکاران ۲۰۰۲).

هیستوپاتولوژی شکمبه

در بررسی هیستوپاتولوژیک شکمبه شکل ۱ در هر سه تیمار به جز مختصری نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای اعم از لنفوسیت، پلاسماسل و ائوزینوفیل در پارین مخاط و در داخل پرزها، مهمترین یافته‌ی پاتولوژیک هایپرکراتوز شفاف سلول‌های شاخی بود که به صورت تجمع سلول‌های بزرگ شاخی شفاف و حضور تعداد زیادی از این سلول‌ها بین لایه گرانولوزا و لایه شاخی، تحت عنوان هایپرکراتوز القاء شده توسط غلات مشاهده شد. این نوع هایپرکراتوز در تیمارهای حاوی پوست انار و پوست انار عمل‌آوری شده با تاناز باکتری و با شدت بیشتر در تیمار حاوی پوست انار مشاهده شد.

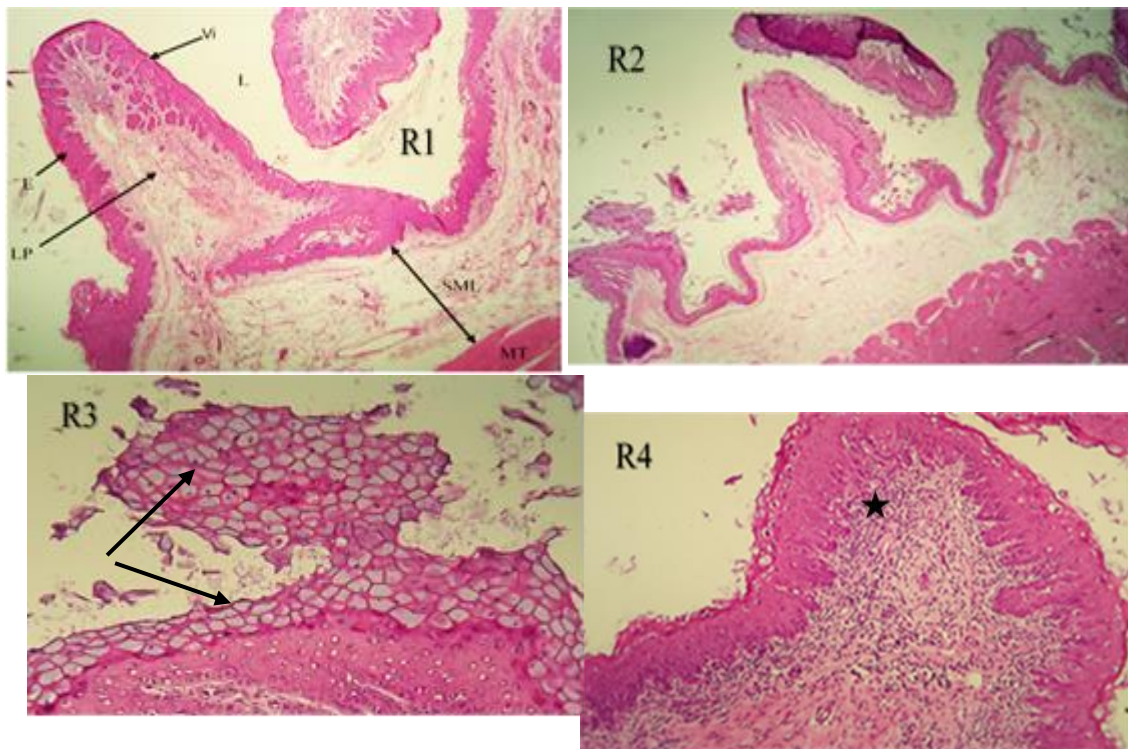


Figure 1- Histopathology of rumen(R). Histological structure of the rumen (R1): L: Lumen, Vi: Villi, E: Epithelium, LP: Lamina Propria, SML: Submucosal Layer, MT. Muscular layer. Hematoxylin-Eosin staining 40X. R2: Rumen villi with Translucent corneum hyperkeratosis. Hematoxylin-Eosin staining X40. R3: Translucent corneum hyperkeratosis in the form of accumulation of large Translucent corneum and the observation of these cells between the granulosa layer and the stratum corneum (Arrows). Hematoxylin-Eosin staining X100. R4: Infiltration of mononuclear inflammatory cells in the Lamina Propria and inside the villi. Hematoxylin-Eosin staining 100X.

اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه کاهش می‌یابد که عامل اصلی آن را تانن بیان کرده‌اند (خفی پور و همکاران ۲۰۰۹) بر این اساس کاهش هایپرکراتوز شفاف لایه‌ی شاخی در تیمار پوست انار عمل آوری شده با باکتری‌های تولید کننده تاناز را می‌توان به کاهش تانن در این تیمار و نقش آن در افزایش جذب اسیدهای چرب فرار از شکمبه نسبت به تیمار حاوی پوست انار نسبت داد

هیستوپاتولوژی نگاری

در بررسی هیستوپاتولوژیک نگاری شکل ۲ در هر سه تیمار به جز مختصری نفوذ سلول‌های التهابی تک هسته‌ای اعم از لنفوسیت و پلاسماسل در پارین مخاط و در داخل پرده‌های نگاری، سایر ساختارهای موفولوژیک سالم و فاقد آثار پاتولوژیک بودند.

پاراکراتوز بافت پوششی شکمبه در واقع نتیجه‌ی تجمع سلول‌های کراتینه‌ی متراکم و فشرده در لایه‌ی شاخی است (هندرز و همکاران ۱۹۶۵) با این حال هایپرکراتوز شفاف در واقع سلول‌های شفاف و واکوئل شده‌ی لایه‌ی شاخی است که به صورت ضعیفی به هم وصل شده‌اند و در بره‌هایی که از رژیم غذایی مبتنی بر دانه تغذیه می‌شوند مشاهده شده‌اند؛ که در این شرایط عملکرد سد بافت پوششی تغییر کرده و انتقال اسیدهای چرب فرار کاهش می‌یابد (استیل و همکاران ۲۰۱۲). چاشنی دل و همکاران (۲۰۱۹) با به کار بردن سطوح مختلف پوست انار در گوسفندان زل، کاهش pH شکمبه را نسبت به تیمار شاهد گزارش کردند که یکی از دلایل این کاهش را تغییر در الگوی باکتری‌های شکمبه به ویژه باکتری‌های تجزیه کننده‌ی سلولز بیان کردند که در این شرایط جذب

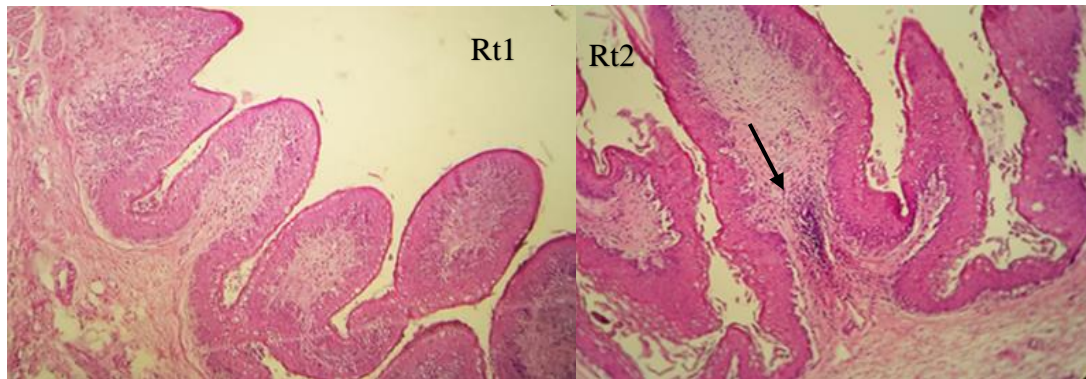


Figure 2- Histopathology of reticulum (Rt): (Rt1): Normal structure of reticulum with papillae. (Rt2): Slight infiltration of mononuclear inflammatory cells, including lymphocytes and plasma cells were observed into the Lamina Propria and Papillae (Arrows). Hematoxylin-Eosin staining. 40X.

هیستوپاتولوژی کبد

در تمام مقاطع کبدی شکل ۳ یافته‌های هیستوپاتولوژیک مشابهی مشاهده شد. از مهمترین یافته‌های آسیب شناسی در کبدهای مورد مطالعه می‌توان به پرخونی، اتساع

وریدهای مرکزی، کانون‌های متعدد نکروز هپاتوسیت‌ها، هپاتیت پری پورتال، اتساع سینوزوئیدها، دژنراسانس هپاتوسیت‌ها و نفوذ سلول‌های التهابی در پارانشیم کبدی اشاره کرد.

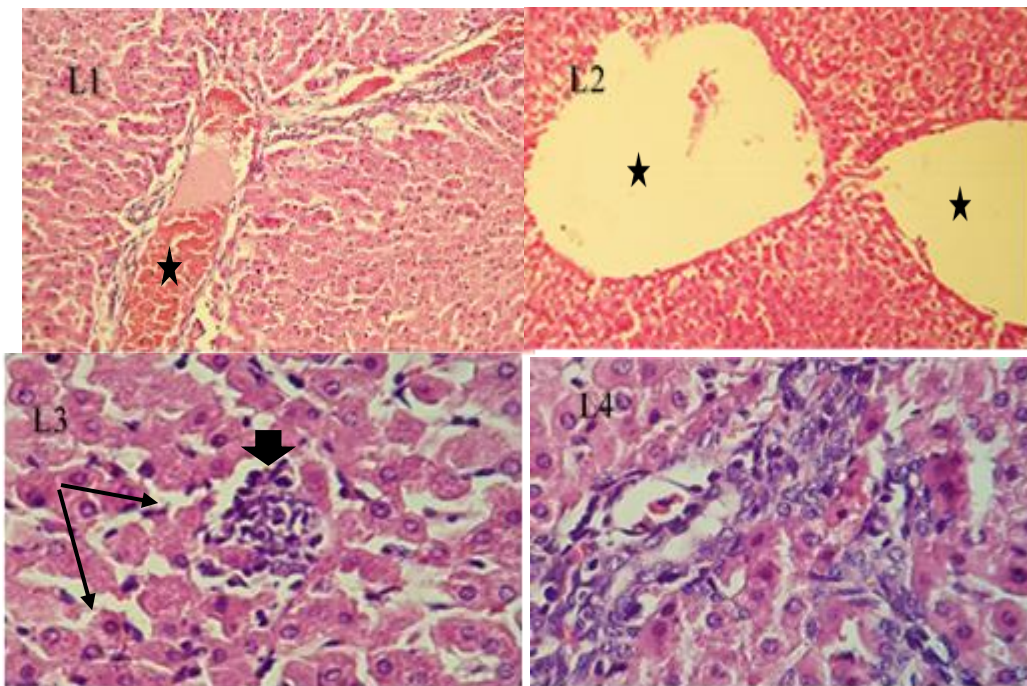


Figure 3- Histopathology of Liver (L): (L1): Severe congestion (Asterisk) and sinusoidal distention were observed. Hematoxylin-Eosin staining 40X. (L2): Central Veins distention (Asterisks) and hepatocytes degeneration. Hematoxylin-Eosin staining 40X. (L3): Focal hepatocytes necrosis (arrow head) and sinusoidal distention (Arrows). Hematoxylin-Eosin staining 100X. (L4): Infiltration of inflammatory cells into the portal regions (Periportal Hepatitis). Hematoxylin-Eosin staining 100X.

به راحتی آسیب ببینند. آسیب کبدی می‌تواند به صورت آسیب ساختاری یا اختلال در عملکرد کبد باشد (گانش و همکاران ۲۰۱۴). مصرف گیاهان حاوی تانن می‌تواند

وقتی مواد حاوی سموم یا سموم وارد کبد می‌شوند، کبد برای خنثی سازی آن بسیار سخت کار خواهد کرد. این امر باعث می‌شود کبدی که در معرض سموم قرار می‌گیرد

موش گزارش کرده‌اند (موتور و همکاران ۲۰۱۴). ترکیبات ساپونین‌دار با دوز ۱۰۰-۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌تواند باعث نفوذ سلول‌های التهابی در کبد موش‌ها شود (اجیباده و فاموروا ۲۰۱۲). مجموع این پژوهش‌ها تائید کننده‌ی آسیب‌های وارد شده در تیمارهای حاوی پوست انار می‌باشند. از طرفی حضور اگزالات و فیتات در سیوس گندم (عقابی و پرکاش ۲۰۱۱) و احتمالاً سایر متابولیت‌های ثانویه‌ی موجود در آن را نیز می‌توان در خصوص آسیب‌های وارده در این تیمار موثر دانست. البته کاهش نامحسوس ضایعات کبدی در تیمار حاوی باکتری تولید کننده‌ی تاناز را شاید بتوان با افزایش زمان آزمایش بهتر مشاهده کرد که نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

اثرات منفی وسیعی در گونه‌های جانوری داشته باشد. این اثرات شامل سمیت کبدی، کاهش مصرف خوراک و کاهش رشد است. از آنجا که تانن می‌تواند قابلیت هضم پروتئین را به علت کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی کاهش دهد، ممکن است به مخاط روده آسیب برساند و یا اثرات سمی سیستمیک ایجاد کند (مولر هاروی ۲۰۰۶). با مصرف برگ گیاه کالیاندرا که حاوی ۷/۴۳ گرم در ۱۰۰ گرم تانن است، در موش‌های ماده، در تیمار حاوی سطوح بالاتر از این گیاه (تانن بیشتر) اتساع عروق خونی و نفوذ سلول‌های التهابی بیشتری مشاهده شد (ستیواتی و همکاران ۲۰۱۶). ویکاکسونو و همکاران (۲۰۱۵) وجود ترکیبات آلکالوئیدی را عامل اتساع فضاهای سینوزوئیدی و اتساع عروق خونی در موش دانسته‌اند. پژوهشگران دیگر ترکیبات آلکالوئیدی را عامل اتساع سینوزوئیدی در کبد

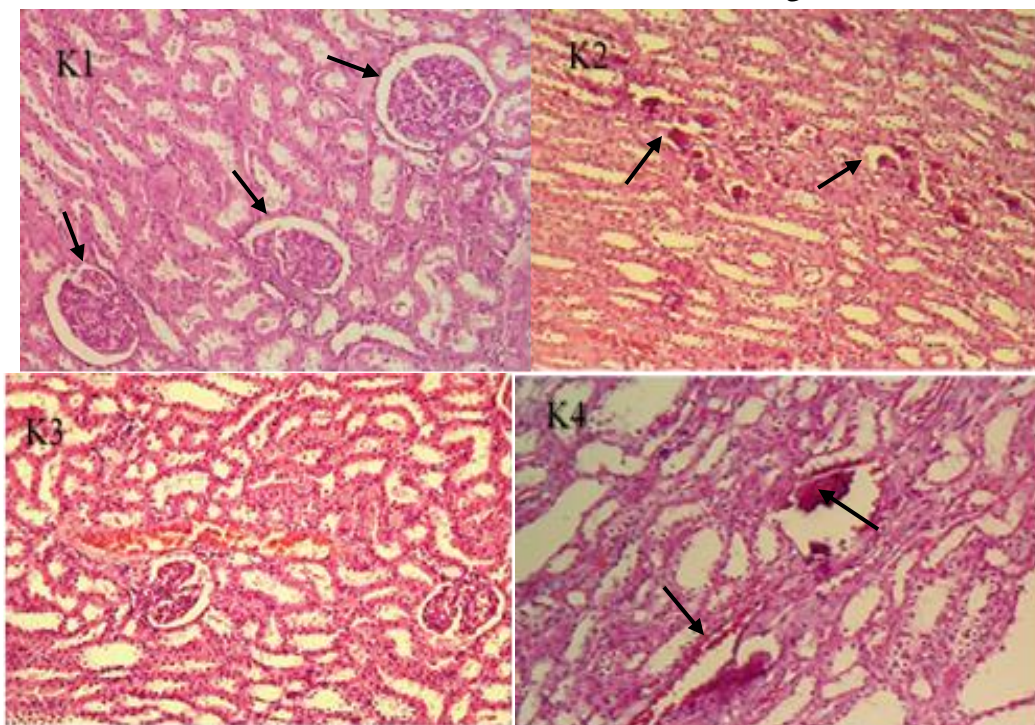


Figure 4- Histopathology of kidney (K): (K1): Urinary tubules degeneration, dilatation of the urinary tubules and distended urinary spaces (Arrows). Hematoxylin-Eosin staining 40X. (K2): Presence of basophilic casts (possibly minerals deposition) (Arrows) were observed into the urinary tubules. Hematoxylin-Eosin staining 40X. (K3): Congestion, Tubular and glomerular degeneration, distension of urinary tubules. Hematoxylin-Eosin staining 40X. (K4): Urinary tubules degeneration and the presence of basophilic casts (possibly minerals deposition) (Arrows) were observed into the urinary tubules. Hematoxylin-Eosin staining 40X.

در کلیه (شکل ۴) نیز یافته‌های آسیب شناسی مشابهی در بین تیمارهای مختلف مشاهده شد. پرخونی، دژنراسیون

هیستوپاتولوژی کلیه

کاهش فیلتراسیون در کلیه‌ها می‌شود (هوادا و همکاران ۲۰۱۰؛ ال کودری و همکاران ۲۰۰۸).

نتیجه گیری کلی

با توجه به اینکه افزایش محتوای تانن در رژیم غذایی ممکن است موجب آسیب‌های متغیر بافت پوششی در امتداد دستگاه گوارش و در نتیجه کاهش جذب مواد مغذی شود؛ و از طرفی به‌کار بردن تاناز باکتریایی باعث کاهش تانن و در واقع افزایش فعالیت باکتری‌های سلولایتیک و افزایش تولید استات می‌شود. نتایج آزمایش حاضر نشان داد استفاده از باکتری کلبسیلا پنومونیه به عنوان تولید کننده تاناز با تانن‌زدایی باعث کاهش ضخامت بافت پوششی، ضخامت پرز، ارتفاع پرز و عمق پرز شکمبه - نگاری شد. از طرفی، کاهش هایپرکراتوز شفاف لایه‌ی شاخی در تیمار پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری تولید کننده تاناز مشاهده شد که می‌تواند باعث افزایش جذب اسیدهای چرب فرار از شکمبه نسبت به تیمار حاوی پوست انار شود و از طرفی چون در تیمار عمل‌آوری شده با باکتری از شدت کست‌های بازوفیلیک در کلیه‌ها نسبت به تیمار پوست انار کاسته شد، لذا با توجه به مجموعه این مزایا می‌توان استفاده از باکتری کلبسیلا پنومونیه را به عنوان افزودنی خوراکی در حین مصرف خوارک‌های حاوی تانن توصیه کرد.

لوله‌های ادراری و گلومرولی، اتساع لوله‌های ادراری و حضور کست‌های بازوفیلیک (احتمالاً رسوب مواد معدنی) در لوله‌های ادراری (این ضایعه اخیر در بین تیمارهای مختلف شدت متفاوتی داشت) مشاهده شد. بطوری که در تیمار پوست انار نسبت به تیمار شاهد و تیمار پوست انار عمل‌آوری شده با باکتری به مراتب بیشتر بوده و در تیمار عمل‌آوری شده با باکتری از شدت کست‌های بازوفیلیک نسبت به تیمار پوست انار کاسته شده بود.

پژوهشگران در بررسی اثر گیاهان کاساوا و علوفه‌ی نخل که حاوی عوامل ضد تغذیه‌ای اگزالات و سیانید هیدروژن هستند؛ روی کلیه‌های بره‌های مورد آزمایش آسیب‌های شدید کلیوی مشاهده کردند (باربوز و همکاران ۲۰۱۹) در آزمایش آن‌ها جیره‌ی غذایی حاوی علوفه‌ی کاساوا باعث اتساع حاد فضاهای ادراری و دژنراسیون توبول‌های کلیوی شد که هنگامی که کاساوا و علوفه‌ی نخل باهم تغذیه شدند، شدت آسیب‌ها بیشتر بود. اگزالات علاوه بر کاهش دسترسی کلسیم، بدلیل کیلات شدن با آن، بلورهای اگزالات کلسیم را تشکیل می‌دهد که باعث التهاب مثانه و نارسایی کلیوی می‌شود (سان و همکاران ۲۰۱۵). در واقع حضور کست‌های بازوفیلیک (احتمالاً رسوب مواد معدنی) در توبول‌های ادراری و پرخونی گلومرول‌ها را می‌توان به اگزالات و فیتات موجود در پوست انار (رومل و همکاران ۲۰۱۶) و سیوس گندم نسبت داد (عقابی و پرکاش ۲۰۱۱). که تشکیل این بلورها علاوه بر دژنراسیون توبول‌های کلیوی و به دنبال آن مرگ سلول‌ها باعث

منابع مورد استفاده

- Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D and Heber D, 2006. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 980-985.
- Ajibade VA and Famurewa O, 2012. Histopathological and Toxicological Effects of Crude Saponin Extract from *Phyllanthus niruri*, L (Syn. *P. franternus* Webster) on Organs in Animal Studies. *Global Journal of Medical Research* 12(1): 30-37.
- Ariza P; Bach A; Stern MD and Hall MB, 2001. Effects of carbohydrates from citrus pulp and hominy feed on microbial fermentation in continuous culture. *Journal of Animal Science* 79: 2713-2718.
- Asadollahi S, Ponnampalam E N, Sari M and Erfanimajd N, 2018. Effects of sugar beet pulp and roasted canola seed, on performance, rumen and small intestine digesta volatile fatty acid concentrations, and small intestine morphology of Arabian lambs. *Livestock Science* 216: 130-137.

- Aschenbach JR, Borau T and Gäbel G, 2002. Glucose uptake via SGLT-1 is stimulated by β 2-adrenoceptors in the ruminal epithelium of sheep. *The Journal of Nutrition* 132(6): 1254-1257.
- Babadi L, Chaji M and MohammadAbadi T, 2018. The effect of feeding whole branch of Albizia lebbeck tree on digestibility, some fermentation characteristics and rumen protozoa population of Najdi goats. *Journal of Animal Science Researches* 28(1): 195-211.
- Barboza SDCR, de Oliveira JS, de Carvalho Souza M T, de Lima Júnior DM, Lima HB and Guerra RR, 2019. Ovines submitted to diets containing cassava foliage hay and spineless cactus forage: histological changes in the digestive and renal systems. *Tropical Animal Health and Production* 51(6): 1689-1697.
- Chashnidel Y, ghadiri M and Teimouri Yansari A, 2019. Effects of different levels of pomegranate peel on ruminal fermentation, degradation parameters, gas production and protozoa population in Zell sheep. *Animal Sciences Journal* 32: 183-196.
- Chavez-Gonzalez M, Rodrigues-Durán LV, Balagurusamy N, PradoBarragán A, Rodrigues R, Conheras JC, Aguilar GN, 2012. Biotechnological advances and challenges of tannase: an overview. *Food Bioprocess Technol* 5(2): 445–459.
- EL-Khodery S, EL-Boshy M, Gaafar K and Elmashad A, 2008. Hypocalcaemia in Ossimi sheep associated with feeding on beet tops (*Beta vulgaris*). *Turkish Journal Veterinary and Animal Science* 32: 199–205.
- Frutos P, Hervas G, Giraldez FJ and Mantecon AR, 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2(2): 191-202.
- Ganash MA, Mujallid MI, Al-Robai AA and Bazzaz AA, 2014. Cytoprotectivity of the natural honey against the toxic effects of Doxorubicin in mice. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 5: 252-260.
- Hinders RG and Owen FG, 1965. Relation of ruminal parakeratosis development to volatile fatty acid absorption. *Journal of Dairy Science* 48: 1069–1073.
- Hovda KE, Guo C, Austin R and Mccartin KE, 2010. Renal toxicity of ethylene glycol results from internalization of calcium oxalate crystals by proximal tubule cells. *Toxicology letters* 192: 365–372.
- Jin YM, Jiang C, Zhang XQ, Shi LF and Wang MZ, 2018. Effect of dietary *Urtica cannabina* on the growth performance, apparent digestibility, rumen fermentation and gastrointestinal morphology of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology* 243: 1-9.
- Jones GA, McAllister TA, Muir AD, and Cheng. KJ, 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and environmental microbiology* 60(4): 1374- 1378.
- Khafipour E, Krause DO and Plaizier JC, 2009. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *Journal of Dairy Science* 92:1712–1724.
- Khorasani O, Chaji M and Baghban F, 2021. Effect of chemical buffer and *Megasphaera elsdenii*-yeast on histomorphometry and histopathology of rumen and liver of Arabian fattening lambs fed with concentrated diets. *Animal Production* 23(1): 47-59.
- Kumar M, Beniwal V, and Salar RK, 2015. Purification and characterization of a thermophilic tannase from *Klebsiella pneumoniae* KP715242. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4(4): 745-751.
- Lohan OP, Lall D, Makkar HPS and Negi SS, 1981. Inhibition of rumen urease activity by tannins in oak leaves [India]. *Indian Journal of Animal Sciences*. (India)
- Makkar HPS, 2000. Quantification of tannins in tree foliage: A laboratory manual for the FAO/IAEA coordinated research project on 'Use of Nuclear and Related Techniques to Develop Simple Tannin Assays for Predicting and Improving the Safety and Efficiency of Feeding Ruminants on Tanniniferous Tree Foliage'. *Animal Production and Health Sub-programme, FAO/IAEA Working Document*. IAEA, Vienna, Austria 1-26.
- Mbatha KR, Downs CT and Nsahlai IV, 2002. The effects of graded levels of dietary tannin on the epithelial tissue of the gastro-intestinal tract and liver and kidney masses of Boer goats. *Animal Science* 74(3): 579-586.

- McSweeney C, Palmer B, McNeill D and Krause D, 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91: 83-93.
- Mitreá L, Vodnar DC, 2019. *Klebsiella pneumoniae*-A Useful Pathogenic Strain for Biotechnological Purposes: Diols Biosynthesis under Controlled and Uncontrolled pH Levels. *Pathogens* 8(4): E293.
- Mohammadabadi T, Gheibipour M, Motamedi H, Chaji M and Abbas BA, 2021. Isolation and identification of tannin-degrading bacteria from deer gut and potency for improving nutritional value of tannin rich plants. *Journal Homepage* 17(1).
- Mohammadabadi T, Jolazadeh A and Ghezi Z, 2020. Effect of treated *Conocarpus erectus* L. leaves with *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* as tannin-degrading bacteria on digestion activity of rumen microorganisms. *Biotechnology in Animal Husbandry* 36(1): 1-16.
- Motor S, Alp H, Şenol S, Pınar N, Motor VK, Kaplan İ, Alp A and Gökçe C, 2014. Comparison of the chronic effects of ribavirin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on pancreatic damage and hepatotoxicity. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7(4): 1005.
- Mueller-Harvey I, 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:2010–2037.
- Naghavi NS, Naderi S, Shahanipour K, Zia MA, and Rastegari Esfahani AA, 2012. Optimization of exopectinase activity of the fungus *Monilia* isolated from tangerine in submerged fermentation. *Biological Journal of Microorganisms*, 1(1): 23-30.
- Ngwa AT, Nsahlai IV and Iji PA, 2003. Effect of feeding legume pods or alfalfa in combination with poor quality grass straw on microbial enzyme activity and production of VFA in the rumen of South African Merino sheep. *Small Ruminant Research* 48(2): 83-94.
- NRC, 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids*. National Academy Press Washington DC.
- Oghbaei M and Prakash J, 2011. Effect of compositional alteration of food matrices and processing on availability of selected nutrients and bioactive components in rice products. *International journal of food sciences and nutrition* 62(3): 250-261.
- Picornell Buendía MR, Pardo-Giménez A and de Juan-Valero JA, 2016. Reuse of degraded *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. substrate by supplementation with wheat bran. Quantitative parameters. *Mycology* 7(2): 53-63 .
- Romelle FD, Rani A and Manohar RS, 2016. Chemical composition of some selected fruit peels. *European Journal of Food Science and Technology* 4(4): 12-21.
- Setyawati I, IGNAD P, Wiratmini NI and Sudatri NW, 2016. Liver histology of female rat (*Rattus norvegicus*) fed diet containing *Calliandra* leaf and pineapple peel during gestation. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry* 5(1): 9-14.
- Sharifi A, Chaji M and Vakili SA, 2018. Effect of Processing Recycled Poultry Bedding with Tannin Extract of Pomegranate Peel on Its Intestinal-Ruminal Digestibility. *Research On Animal Production (Scientific and Research)* 9(21): 62-72.
- Steele MA; Greenwood SL; Croom J and McBride BW, 2012. An increase in dietary non-structural carbohydrates alters the structure and metabolism of the rumen epithelium in lambs. *Canadian Journal of Animal Science* 92: 123–130.
- Sun XY, Ouyang JM, Zhu WY, Li YB and Gan QZ, 2015. Size-dependent toxicity and interactions of calcium oxalate dihydrate crystals on Vero renal epithelial cells. *Journal of Materials Chemistry*, 3: 1864-1878.
- Waghorn G and Shelton I, 1997. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *The Journal of Agricultural Science* 128: 365-372.
- Wang YH, Xu M, Wang F.N, Yu ZP, Yao JH, Zan LS and Yang FX, 2009. Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats. *Livestock Science* 122(1): 48-52.
- Wicaksono HS, Narayani I and Setyawati I, 2015. Structure of mice liver after giving red *calliandra* leaf extract, *Journal Symbiosis* 3(1): 258- 268.

Use of pomegranate peel and pomegranate peel treated with tannase-producing bacteria on the histomorphometry and histopathology of rumen, liver and kidneys in fattening lambs

Z Jahanara¹, M Chaji^{2*}, O Khorasani³ and F Baghban⁴

Accepted: October 29, 2021

Received: April 19, 2022

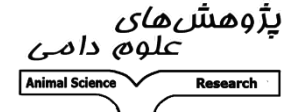

¹ Former MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran

² Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran

³ PhD of Animal Nutrition, Kharazmi Industrial School, of Dezful

⁴ Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Azad University of Yasoj, Yasij, Iran

*Corresponding author: E mail: chaji@asnrukh.ac.ir

| | | |
|--|--|--|
|  <p>پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research</p> | <p>Journal of Animal Science/vol.33 No.1/ 2023/pp 97-111 https://animalscience.tabrizu.ac.ir</p> |  <p>OPEN ACCESS</p> |
| <p>© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/AS.2022.48700.1632</p> | | |

Introduction: Digestion and absorption are related to the growth and development of ruminal villi and intestinal villi and one of the most important factors affecting the growth of ruminal epithelium is diet and increasing the villi height and villi surface increases the absorption capacity and helps maintain ruminal pH (Wang et al. 2009). Epithelial tissue cells play an important role in maintaining stable ruminal conditions, and changes in morphology predispose to the dysfunction of these tissues (Korasani et al. 2021). Pomegranate peel contains large amounts of secondary metabolites such as tannins, saponins, and polyphenolic compounds with various properties such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and immune-stimulating effects (Adams et al. 2006). The main feature of tannins is their binding to proteins, which inhibits the action of enzymes. Tannins can inhibit the activity of microbes and inactivate extracellular endoglucanase in some fiber-digesting bacteria (Babadi et al. 2018). Tannins prevent the digestion of lignocellulosic substances that are dependent on extracellular enzymes, prevent microbes from attaching to food particles, reduce their digestibility, and make them more persistent in the rumen (McSweeney et al. 2001). Bacteria, yeasts, and filamentous fungi are capable of producing tannins. Bacterial tannase can effectively break down and hydrolyze natural tannins and tannic acid (Kumar et al. 2015). Tanase produced by *Klebsiella pneumoniae* is more stable in the acidic pH range of 4.5 to 5.5. Therefore, the tannase produced by *Klebsiella pneumoniae* is of high value for various industrial applications due to its acidophilic nature and thermal stability (Kumar et al. 2015). Several researchers have reported that strains of *Klebsiella pneumoniae* are able to degrade phenolic compounds; in fact, using bacteria could overcome tannins by altering, destroying, and inactivating tannins. These isolates are likely to increase pectinase and cellulase activity by altering the pH and reducing the toxic effects of tannin; in fact, reducing phenols and tannins increases digestibility by ruminal microorganisms. Therefore, in tropical and subtropical regions, the processing of tannin-rich trees with tannase is very important in animal nutrition systems (Mohammadabadi et al. 2020).

Material and methods: The present experiment was performed in the educational-research farm and laboratories of Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Fifteen Arabic male lambs with nine or ten months old and initial body weight of 39.75 ± 7.91 kg were used in a completely randomized design with three treatments and five replicates. The trial period consisted of

35 days including 14 days of habituation period and 21 days of recording period. The lambs were randomly assigned to one of the three treatments: 1- control (diet without pomegranate peel) 2- control diet + 20% pomegranate peel 3- control diet + 20% pomegranate peel treated with *Klebsiella pneumoniae*, which produces tannase. The diets were adjusted using the small ruminant's nutrition requirements (NRC 2007). The lambs were fed a fully mixed ratio at two meals (8 and 16 hours) with free access to water. At the end of the experiment, the lambs of each treatment were slaughtered. The parts about one square centimeter were separated from the abdominal area of rumen and reticulum and one cubic centimeter from liver and kidney and each sample were fixed separately in a 10% solution of neutral formalin (khorasani et al 2021). Micrometric studies including villi height, villi thickness, villi depth, epithelial thickness, muscle layer thickness, and ruminal wall thickness were examined histomorphometrically.

Results and discussion: The thickness of epithelial tissue and papillae thickness of reticulum in the treatment containing pomegranate peel treated with bacteria were less than other treatments ($P < 0.05$). The thickness of epithelial tissue and papillae thickness of rumen in the treatment containing pomegranate peel treated with bacteria were less than other treatments and were significant compared with the treatment containing pomegranate peel ($P < 0.05$). The height and depth of ruminal villi in the control treatment were significantly higher than other treatments ($P < 0.05$) and this difference was greater than the treatment containing bacteria. The most important pathological finding in the rumen was translucent corneum hyperkeratosis which was more strongly observed in the treatment containing pomegranate peel. In the treated group with bacteria, basophilic casts (possibly minerals deposition) in the kidneys was reduced compared with the treatment of pomegranate peel. In the treatment containing pomegranate peel, due to the reduction of digestibility of nutrients including cellulosic substances and the decrease in the activity of cellulolytic bacteria in the rumen, the thickness of epithelial tissue and villi thickness increased compared with the treatment containing pomegranate peel processed with bacterial. Because bacterial tannase reduces tannin and actually increases the activity of cellulolytic bacteria and increases acetate production (Mohammadabadi et al. 2020). The reduction of translucent corneum hyperkeratosis in the treatment of pomegranate peel treated with tannase-producing bacteria can be attributed to the reduction of tannin in this treatment and its role in increasing the uptake of ruminal fatty acids compared with the treatment containing pomegranate peel (Khafipour et al. 2009). The presence of basophilic casts into the urinary tubules and glomerular hyperemia can be attributed to oxalate and phytate in pomegranate peel (Romelle et al. 2016).

Conclusion: Compared with control and pomegranate peel treatments, the treatment of pomegranate peel treated with *Klebsiella pneumoniae* can improve the status of rumen and reticulum tissue markers and relative reduction of ruminal tissue lesions and the severity of basophilic casts in the kidneys compared with pomegranate peel treatment. Therefore, considering the total of these benefits, the use of *Klebsiella pneumoniae* in the consumption of foods containing tannins can be recommended.

Keywords: Hyperkeratosis, Inflammatory cells, Reticulum, Tannin, Tissue, Villi