DOI:10.22092/VJ.2022.354804.1858
شماره ۱۳۹ تابستان ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثرات مصرف دو گیاه دارویی رزماری و آویشن و اسانس آن‌ها بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیرپذیری شکمبه‌گاوهای شیری در شرایط برون‌تنی

• **سید محسن حسینی (نویسنده مسئول)**
متخصص تغذیه دام، دانشگاه آزاد اسلامی شاهین شهر، اصفهان، ایران
• **مهدی مهرآبادی**
متخصص تغذیه دام، دانشکده فنی کشاورزی پاکدشت، تهران، ایران
• **سید مسعود داودی**
متخصص تغذیه دام، دانشگاه آزاد اسلامی شاهین شهر، اصفهان، ایران
• **حمید رضا اسماعیلی**
متخصص تغذیه دام، شرکت کشاورزی و دامپروری فجر اصفهان
• **حسین خوش‌اخلاق**
متخصص تغذیه دام، شرکت کشاورزی و دامپروری فجر اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۹-۰۳-۱۴۰۰ تاریخ پذیرش:۱۵-۰۴-۱۴۰۱
تاریخ بازنگری: ۱۱-۰۴-۱۴۰۱ تاریخ انتشار: ۱-۰۴-۱۴۰۲

Email: hoseini.mohsen67@yahoo.com

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر دو گیاه دارویی آویشن و رزماری و نیز اسانس این گیاهان، بر فراسنجه‌های تولید گاز، قابلیت هضم ماده مغذی، فراسنجه‌های تخمیرپذیری شکمبه و متان تولیدی صورت پذیرفت. آزمون تولید گاز با مدّت زمان کشت ۹۶ ساعته در قالب طرح کاملاً تصادفی، با چهار تکرار در هر تیمار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۱) جیره پایه با نسبت علوفه به کنسانتره ۵۰:۵۰ بدون افزودن گیاه دارویی و اسانس به‌عنوان تیمار شاهد، ۲) تیمار شاهد + ۱۵ گرم در کیلوگرم آویشن ۳) تیمار شاهد + ۱۵ گرم در کیلوگرم رزماری ۴) تیمار شاهد + ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس آویشن و ۵) تیمار شاهد + ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس رزماری بودند. نتایج این پژوهش نشان‌داد که کاربرد اسانس‌های گیاهی باعث افزایش معنی‌دار گاز تولیدی از بخش قابل تخمیر (b) و ثابت نرخ تولید گاز (c) در مقایسه با تیمار شاهد گردید (P<۰/۰۵). تیمارهای حاوی اسانس قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و میزان اسیدهای چرب فرّار کل و اسید پروپیونیک را در مقایسه با شاهد افزایش دادند (P<۰/۰۵). تولید متان به‌صورت میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک و نیتروژن آمونیاکی در تمامی تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). به‌طورکلی با نتایج گزارش شده از این پژوهش، به‌نظر می‌رسد توان تغییر فرآیندهای تخمیرپذیری شکمبه با استفاده از گیاهان دارویی و اسانس‌های آن‌ها وجود دارد، اگرچه آزمایش‌های تکمیلی بیشتری برای بررسی این اثرات مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: آویشن، رزماری، فراسنجه‌های تخمیرپذیری شکمبه، اسانس‌های گیاهی، فراسنجه‌های تولید گاز

Veterinary Researches & Biological Products No 139 pp: 2-10

The Effects of Rosemary and Thyme Medicinal Herbs Consumption and Their Essences on Gas Production and Rumen Fermentation Parameters in Dairy Cows Under in vitro Conditions

By: Hosseini, S.M., (Corresponding Author) Islamic Azad University of Shahin Shahr, Isfahan, Iran. Mehrabadi, M., Agricultural Technical University of Pakdasht, Tehran, Iran. Davoodi S. M. Islamic azad university of shahin shahr, Isfahan, Iran. Esmaeili, H.R., Fajr Agriculture Company of Isfahan, Iran. and Khoshakhlagh, H., Fajr Agriculture Company of Isfahan, Iran.

Received: 2021-06-09 **Accepted:2022-07-06**
Revised: 2021-07-02 **Published:2023-07-22**

Email: hoseini.mohsen67@yahoo.com

The aim of this study was to investigate the effects of two medicinal plants of thyme and rosemary and their essences on gas production, digestibility, ruminal fermentation and methane production parameters. The gas production test was conducted with a 96-hour cultivation time in the form of a completely randomized design, along with four repetitions per treatment. The treatments consisted of: 1) basal diet with - a forage-to-concentrate ratio of 50:50 without addition of the medicinal herbs and essences as the control treatment; 2) control treatment + 15 g/kg of thyme; 3) control treatment + 15 g/kg of rosemary; 4) control treatment + 100 mg/kg essence of thyme and 5) control treatment + 100 mg/kg of rosemary essence.The results of this study indicated that the application of the essences caused a significant increase in the gas production potential from the fermentable segment (b) and the gas production rate constant (c) compared to the control treatment ($P<0.05$). The treatments containing essences increased dry matter digestibility, organic matter and total volatile fatty acids and propionic acid as compared to the control ($P<0.05$). Methane production in milliliters per gram of dry matter and ammonia nitrogen decreased remarkably in all experimental treatments compared to the control treatment($P<0.05$). Overall, according to the results of this study, it seems that changes to the ruminal fermentation processes are possible by using the herbs and their essences, although additional –experiments are - needed to investigate these effects.

Key words: Thyme, *Rosemary*, Ruminal Fermentation Parameters, Herbal Essences, Gas Production Parameters

مقدمه

تحت برخی رژیم‌های تغذیه‌ای، شرایط نامساعد ایجاد شده در شکمبه ممکن است اکوسیستم (بوم‌سازگان) شکمبه را تغییر داده و منجر به ایجاد اختلالات مختلف متابولیکی گردد (۶). کاهش این اختلالات در شکمبه بازدهی حیوان را افزایش خواهد داد. پس از ژانویه ۲۰۰۶ که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و باقی‌ماندن در محصولات دامی و انتقال آن‌ها از طریق شیر و گوشت به انسان ممنوع شد (۱۲)، استفاده از مکمل‌های گیاهی به‌صورت گیاه کامل و یا عصاره‌های آن‌ها گسترش یافت تا این اثرات منفی را کاهش دهند (۱۵). بررسی‌های پیشین منتشر شده در مورد گیاهان دارویی و عصاره‌های آن‌ها نشان‌داده‌اند که گیاهان و ترکیبات فعال آن‌ها می‌توانند سبب تغییر جمعیت میکروبی شکمبه (۲۰)، کاهش متان تولیدی (۱۳)، تغییر میزان اسیدهای چرب فرّار (۶) و قابلیت هضم شکمبه‌ای (۱۷) را تحت تأثیر قرار داده‌اند. ترکیبات فعّال گیاهی مانند ساپونین‌ها، تانن‌ها، ارگانوسولفورها و سایر ترکیبات به‌علّت اثر بازدارنده بر فعالیت متانوژن‌های شکمبه می‌توانند سبب کاهش میزان متان تولیدی در شکمبه شوند (۱۶) و از آنجایی که متان تولیدی در شکمبه مسئول هدرروی ۲ تا ۱۲ درصد انرژی خام مصرفی حیواناست (۱۸) و به‌جهت آنکه اتلاف متان توسط نشخوارکنندگان سهم قابل توجهی در تولید گازهای گلخانه‌ای دارد (۱۵)، ضرورت کاهش دفع متان بدون تغییر تولیدات هم به‌عنوان راه‌کار کاهش گازهای گلخانه‌ای و هم بهبود ضریب تبدیل غذایی بسیار مهم است. استفاده از گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها به‌عنوان افزودنی در تغذیه نشخوارکنندگان زمانی قابل قبول است که مقادیر استفاده شده، بدون اثر منفی بر تخمیر شکمبه اثرات مثبتی بر جمعیت میکروبی داشته باشند. اطلاعات محدودی در مورد بهترین مقدار قابل استفاده جهت بررسی اثر گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها به‌عنوان افزودنی در خوراک نشخوارکنندگان وجود دارد. به‌نظر می‌رسد برخلاف آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم، امکان ایجاد مقاومت به عصاره‌های گیاهی ضد میکروبی مانند روغن‌های اسانسی در میکروارگانیسم‌ها وجود ندارد، زیرا روغن‌های اسانسی مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات شیمیایی هستند که بسیاری از آن‌ها فعّالیت ضد میکروبی با نحوه‌ی عمل متفاوت دارند و در نتیجه امکان ایجاد مکانیسم‌های متفاوت برای میکروارگانیسم‌ها غیر ممکن است (۹).

با اینکه مطالعات زیادی در ارتباط با تأثیر افزودن گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه انجام شده است، اما از آنجایی که خواص گیاهان دارویی با توجه به گونه، شرایط اقلیمی، زمان برداشت گیاه و غلظت مورد استفاده متفاوت است. لذا نتایج گزارش شده در مطالعات پیشین نیز متناقض بوده است، بنابراین این پژوهش به‌منظور بررسی اثر دو گیاه دارویی رزماری و آویشن و اسانس این دو گیاه بر فراسنجه‌های تولید گاز، قابلیت هضم ماده مغذی، فراسنجه‌های

تخمیرپذیری شکمبه و متان تولیدی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها

دو گیاه دارویی آویشن (*Thymus vulgaris*) و رزماری (*Rosmarinus officinalis*) سالم و کامل و بدون آسیب‌دیدگی از مزرعه گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه فنی و حرفه‌ای پاکدشت برداشت‌شده و کل بخش ساقه و برگ گیاه، به‌منظور تهیه پودر مورد استفاده قرار گرفت. گیاهان در محل آزمایشگاه به‌صورت هوا خشک طی مدّت ۱۰ روز خشک شدند. جهت استخراج اسانس‌گیاهاناز روش تقطیر با آب و دستگاه اسانس‌گیری کلونجر استفاده گردید. بدین ترتیب که ۱۰۰ گرم از گیاه خشک ابتدا با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی (Cyclotec, ۱۸۸۳, Sample mill) با قطر منافذ ۲ میلی‌متر آسیاب و سپس به بالن ۲ لیتری کلونجر منتقل‌گردید و در ادامه مقدار یک لیتر آب مقطر به آن افزوده گردید. عملیات اسانس‌گیری به‌مدّت ۴ ساعت انجام پذیرفت. در طول عملیات اسانس‌گیری، به‌علّت فرّار بودن، اسانس همراه بخار آب تقطیر شد و در لوله جمع‌آوری کننده کلونجر جمع‌آوری گردید. با توجه به اینکه چگالی اسانس از چگالی آب کمتر است، بنابراین اسانس استخراج‌شده روی فاز آبی قرار گرفته و به راحتی توسط شیر تخلیه جداسازی شد. عمل آب‌گیری از اسانس حاصل توسط سولفات سدیم بدون آب (Na_2So_4) صورت پذیرفت (۱۲).

تیمارهای آزمایشی و جیره غذایی

جیره غذایی براساس انجمن ملی تحقیقات و برای نیازهای گاوهای متوسط تولید و بانسبت علوفه به کنسانتره ۵۰:۵۰ تهیه گردید. جدول ۱ ترکیبات جیره غذایی استفاده شده در آزمایش را نشان می‌دهد. تیمارهای آزمایشی شامل ۱) جیره پایه با نسبت علوفه به کنسانتره ۵۰:۵۰ بدون افزودن گیاه دارویی و اسانس به عنوان تیمار شاهد، ۲) تیمار شاهد + ۱۵ گرم در کیلوگرم آویشن ۳) تیمار شاهد + ۱۵ گرم در کیلوگرم رزماری ۴) تیمار شاهد + ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس آویشن و ۵) تیمار شاهد + ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس رزماری بودند.

تعیین ترکیبات شیمیایی جیره غذایی و گیاهان دارویی

پس از تنظیم جیره و تهیه گیاهان دارویی نمونه‌ها با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی (Germany,۱۵X۲۰ Retsch Muhle mill, Retch EPP) با قطر منافذ یک میلی‌متر آسیاب شدند. در این مرحله تجزیه شیمیایی جیره آزمایشی و گیاهان دارویی (آویشن و رزماری) بر اساس روش‌های پیشنهادی AOAC (۲۰۰۰) با چهار تکرار انجام گرفت (۳). جدول ۲ آنالیز مواد مغذی گیاهان دارویی و جیره غذایی را نشان می‌دهد.

تهیه مایع شکمبه

مایع شکمبه از سه رأس گاو هلشتاین فیستولا شده با میانگین وزن ۶۸۰±۲۱ قبل از وعده خوراک‌دهی صبحگاهی که از جیره ثابت گاوداری با نسبت علوفه به کنسانتره ۵۰:۵۰ تغذیه می‌شدند جمع‌آوری گردید. مایع شکمبه توسط پارچه متقالی چهار لایه صاف شد و در داخل فلاسک حاوی آب گرم سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. مایع شکمبه مورد استفاده در آزمایش پس از مخلوط شدن مایع شکمبه هر سه رأس گاو مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز

تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی مطابق با روش ارائه شده توسط منک و استینگاس(۱۹۸۸) انجام گردید (۲۵). مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه خوراک توزین و در داخل ویال‌های شیشه‌ای ۱۲۰ میلی‌لیتری (پنج تکرار) ریخته شد. مایع شکمبه گرفته شده به محلول بزاق مصنوعی با نسبت ۱ به ۲ (یک قسمت مایع شکمبه)، اضافه شد و جهت پر کردن شیشه‌ها استفاده شد. داخل هر ویال ۳۰ میلی‌لیتر از این مخلوط توسط پمپ اتوماتیک

جدول ۱- موادخوراکی مورد استفاده در جیره آزمایشی.

ترکیبات جیره	درصد در ماده خشک	ترکیبات جیره	درصد در ماده خشک
دانه ذرت آسیاب شده	۱۸	کربنات کلسیم	۰/۱۸
دانه جو آسیاب شده	۲۰/۴	مکمل معدنی ویتامینی[1]	۰/۱۲
کنجاله سویا	۴/۸	نمک	۰/۱۲
کنجاله تخم پنبه	۷/۲	یونجه	۶
تفاله چغندر قند	۲/۸۸	سیلوی ذرت	۱۶
سبوس گندم	۶/۳	کاه	۱۸

[1] هر کیلوگرم از مکمل معدنی و ویتامینی حاوی ۱۹ گرم کلسیم، ۹۰ گرم فسفر، ۵۰ گرم سدیم، ۱۹گرم منیزیم، ۳ گرم آهن، ۳۰۰ میلی‌گرم مس، ۲۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۳۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۱۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۱۰۰ میلی‌گرم ید، ۱ میلی‌گرم سلنیوم، ۳۰۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدانت (B.H.T)، ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D۳ و ۱۰۰ میلی گرم ویتامین E بود.

اضافه گردید. در حین پرکردن شیشه‌ها نیز همچنان گاز دی اکسیدکربن به محلول دمیده شد. زمان شروع وارد کردن مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی به‌داخل اولین ویال، به‌عنوان زمان صفر ثبت شد. سر ویال‌ها با استفاده از درپوش لاستیکیو پوشش آلومینیومی به‌وسیله دستگاه لاستیک‌بند بسته شد و در داخل حمام (بن‌ماری) ۳۹ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. برای کنترل داده‌ها در هر تیمار دو نمونه بلانک (فاقد ماده خوراکی) در حمام بن‌ماری قرار گرفتند. فشار گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت کشت (انکوباسیون) به‌وسیله دستگاه فشارسنج دیجیتال (مدل SEDPGB۰۰۱۵PG۵ ساخت کشور ایران) با دقت ۰/۰۱ PSI (۱PSI= ۰/۰۶۸۰۵اتمسفر) اندازه‌گیری شد و بر اساس مدل به‌دست آمده در شرایط آزمایشگاهی تبدیل به حجم شد. یک‌سری از بطری‌ها برای آزمون ۹۶ ساعت و سری دیگر برای آزمون ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین فراسنجه‌های تولید گاز از فرمول $P= b\ (1-e^{-ct})$ که توسط مک‌دونالد (۱۹۸۱)ارائه شده است، استفاده گردید (۲۳). در این فرمول: P= حجم تولید گاز در زمان t به‌صورت تجمّعی، C=ثابت نرخ تولید گاز در ساعت (میلی‌لیتر در ساعت)، b=گاز تولید شده از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، t=مدّت زمان کشت بر حسب ساعت و e= عدد نپری. پس از پایان کامل دوره کشت در طی ۹۶ ساعت، نیمه عمر تولید گاز یعنی زمانی که نیمی از حداکثر گاز تولید شده بود با استفاده از رابطه $t_{1/2}=(\ln 2/c)+L$ محاسبه گردید و سپس دور دوّم انکوباسیون با هدف متوقف کردن آن در زمان ($t_{1/2}$) و ۲۴ ساعت انجام شد؛ که در این معادله $t_{1/2}$= نیمه عمر تولید گاز به ساعت، c= نرخ تولید گاز از بخش نامحلول در زمان (میلی‌لیتر بر ساعت) و L= فاز تاخیر به ساعت بود.

اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی و متان تولیدی

میزان گاز متان تولیدی در ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون با استفاده از دستگاه فوم‌نگار گازی یا کروماتوگرافی مدل UNICAM ۴۶۰۰ و با استفاده از استاندارد خارجی تعیین شد. برای اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی از روش اسپکترومتریک استفاده شد. ابتدا دو محلول فنولی و قلیایی آماده شد به این ترتیب که برای محلول فنولی، ۵ گرم فنول به‌علاوه ۲۵ میلی‌گرم سدیم نیتروپروساید به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسید. برای این کار از آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شد و برای محلول قلیایی، ۲/۵ گرم هیدروکسید سدیم به‌علاوه ۴/۲ میلی‌لیتر سدیم هایپوکلرید با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسید. سپس یک سری محلول استاندارد به‌ترتیب با غلظت‌هایی از ۱۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر سولفات آمونیوم آماده شد. در لوله‌های آزمایش ابتدا ۵ میلی‌لیتر از محلول یک ریخته شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از محلول‌های استاندارد به لوله‌های آزمایش افزوده شد. سپس درب لوله‌ها با پارافیلم پوشانیده و محکم تکان داده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر محلول دو به لوله‌ها اضافه شد و مجدداً تکان داده شد. لوله‌ها در جا لوله‌ای فلزی قرار داده شدند و به‌مدّت ۲۰ دقیقه در داخل بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس لوله‌ها از بن‌ماری خارج شدند و میزان جذب نور محتویات داخل آن‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد.

اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرّار

مقدار چهار صد میکرولیتر نمونه مایع شکمبه با صد میکرولیتر از استاندارد ۴- متیل والریک اسید مخلوط شده به‌مقدار ۹ میکرولیتر از هر نمونه در هر بار به‌درون دستگاه گاز کروماتوگرافی (PHILIPS – GC – PU۴۴۱۰) با نوع ستون PEG ۱۰ (طول ۲ متر و قطر ۴۵ میلی‌متر) و دکتور FID تزریق شد. میزان جریان گازهای مختلف به‌صورت جریان نیتروژن(۳۳ میلی‌لیتر در دقیقه)، جریان هیدروژن(۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه)، جریان هوا (۳۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه) و برنامه حرارتی دستگاه نیز به‌صورت دمای دتکتور ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد، دمای تزریق ۲۲۰ درجه‌سانتی‌گراد، دمای

جدول ۲- آنالیز شیمیایی جیره و گیاهان دارویی مورد استفاده در آزمایش (گرم بر کیلوگرم ماده خشک).

ماده خشک	جیره آزمایشی	آویشن	رزماری
ماده خشک	۸۸۰/۱۹	۹۲۰/۱۲	۹۱۸/۲۵
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی	۲۲۸/۰۲	۳۰۱/۰۲	۳۴۰/۵۰
الیاف نامحلول در شوینده خنثی	۴۸۳/۱۲	۳۸۱/۲۳	۴۵۱/۹۱
عصاره اتری	۳۳/۲۰	۴۰/۴۴	۳۶/۵۶
خاکستر	۷۷/۶۱	۸۱/۲۳	۸۰/۸۳
پروتئین خام	۱۳۱/۲۰	۱۰۰/۱۳	۸۷/۳۶
ماده آلی[1]	۹۲۲/۴۱	۸۹۹/۶۹	۹۱۲/۴۱
کربوهیدرات غیر الیافی[2]	۲۷۵/۱۵	۳۹۶/۹۷	۳۴۳/۳۴

[1] ماده آلی = خاکستر-۱۰۰. [2] NFC=100-[% CP+% NDF+% ash +%fat]

کولینگ ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای رمپ ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه بود.

اندازه‌گیری قابلیت هضم مواد مغذی

قابلیت هضم ماده خشک از تفاوت میزان ماده خشک جیره قبل از انکوبه کردن و مقدار ماده خشک هضم نشده بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تخمین انرژی قابل متابولیسم (ME) و قابلیت هضم ماده آلی (OMD) به‌وسیله فرمول‌های ارائه شده توسط منک و استینگاس (۱۹۸۸) صورت گرفت.

انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)= ۲/۲۰ + ۰/۱۳۶(گاز تولیدی به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک در زمان ۲۴ ساعت) +۰/۰۵۷ (چربی خام) ۰/۰۰۰۲۹ + (پروتئین خام)

قابلیت هضم ماده آلی (درصد) = ۱۴/۸۸ + ۰/۸۸۹ (گاز تولیدی به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک در زمان ۲۴ ساعت) + ۰/۴۵ (درصد پروتئین خام)+ ۰/۰۶۵۱(درصد خاکستر)

تخمین اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) به‌وسیله فرمول ماکار (۲۲) صورت گرفت.

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول) = ۰/۰۲۲۲(گاز تولیدی به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک در زمان ۲۴ ساعت) – ۰/۰۰۴۲۵

تجزیه آماری

داده‌های مربوط به هر بخش از آزمایش با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS ویرایش ۹/۱، در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه آماری شده و در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمار، آزمون دانکن برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد (P<۰/۰۵). مدل آماری طرح کاملا تصادفی مورد استفاده به صورت $Yij = \mu + Ti + \varepsilon ij$ بود، که در این معادله: Yij= مشاهده عمومی؛ μ= میانگین کل؛ Ti= اثر تیمار و εij= خطای باقیمانده می‌باشد.

نتایج و بحث

اثر گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها بر فراسنجه‌های تولید گاز

فراسنجه‌های تولید گاز شامل حجم کل گاز تولید شده در ساعت‌های ۲۴ و ۹۶، تولید گاز از بخش نامحلول ولی قابل تخمیر (b)، ثابت سرعت تولید گاز (c) و زمان نصف حداکثر گاز تولیدی ($t_{1/2}$) در جدول ۳ نشان داده شده است. در مقایسه با تیمار شاهد، افزودن اسانس‌های گیاهی آویشن و رزماری باعث کاهش معنی‌دار پتانسیل تولید گاز گردید، درحالی‌که ثابت نرخ تولید گاز با افزودن اسانس آویشن به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). تولید تجمّعی گاز ۹۶ ساعت تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت، به‌طوری‌که استفاده از اسانس‌های گیاهی تولید گاز ۹۶ ساعت را در مقایسه با گیاهان دارویی و شاهد افزایش داد (P<۰/۰۵). بیشینه‌ی گاز تولیدی در تیمار اسانس آویشن (۱۹۰/۹۲ میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) و کمینه‌ی آن در تیمار شاهد (۱۶۷/۴۵ میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) مشاهده گردید.

منک و استینگاس (۱۹۸۸) نشان دادند که میزان گاز تولید شده با گوارش‌پذیری مواد خوراکی رابطه مستقیم دارد و هرچقدر میزان گوارش‌پذیری بیشتر باشد میزان گاز تولید شده نیز بیشتر است (۲۵). به‌طور مشابه با آن‌ها، گزارش شده است که حجم گاز تولیدی با توانایی هضم ماده خشک و ماده آلی، مصرف خوراک و سرعت رشد حیوان

جدول ۳-اثر گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها بر فراسنجه‌های تولید گاز (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک).

تیمار	فراسنجه‌های تخمیر			تولید گاز	
	b (میلی‌لیتر)	c (میلی‌لیتر بر ساعت)	۲/٤۱	۲۴ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۲۳۲/۱۳ a	۰/۰۷ b	۱۱/۵۵	۶۳/۱۳	۱۶۷/۴۵ b
پودر آویشن	۲۰۰/۲۹ a	۰/۰۷ b	۱۰/۸۹	۷۰/۲۱	۱۷۳/۲۰ b
پودر رزماری	۲۲۸/۹۰ a	۰/۰۸ b	۱۲/۱۰	۶۲/۱۹	۱۷۰/۹۰ b
اسانس آویشن	۲۶۷/۹۶ b	۰/۱۰ a	۹/۸۰	۷۸/۲۰	۱۹۰/۹۲ a
اسانس رزماری	۲۸۳/۳۹ b	۰/۱۰ a	۱۰/۲۳	۷۳/۹۰	۱۸۱/۱۲ a
میانگین خطای استاندارد*	۱۵/۱۷	۰/۰۱	۲/۴۲	۵/۳۸	۳/۱۰
سطح احتمال معنی‌دار شدن**	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۰۳

وجودحروف‌غیرمشترک در هرستون‌نشان‌دهنده‌تفاوت‌معنی‌دار در مقایسه‌باتیمارشاهد است (P=۰/۰۵).

b: تولید گاز از بخش نامحلول ولی قابل تخمیر (به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک). c: ثابت سرعت تولید گاز. $t_{1/2}$: زمان نصف حداکثر گاز تولیدی (ساعت).

*SEM**p-value

همبستگی بالایی دارد (۹). بنابراین افزایش میزان گاز تولید شده در تیمارها و کاهش سرعت روند تولید گاز با افزودن اسانس‌های گیاهی می‌تواند نشان‌دهنده بهبود گوارش‌پذیری مواد خوراکی با افزودن این ترکیبات باشد. حجم گاز تولیدی در شرایط آزمایشگاهی فراسنجه‌ای خوب برای پیش‌بینی قابلیت هضم، تخمیر محصولات نهایی و سنتز پروتئین میکروبی است. قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی همبستگی بالایی با میزان گاز تولیدی دارند (۱۰). کل حجم گاز تولیدی اندازه‌گیری شده در شرایط برون‌تنی شامل دی اکسید کربن و متان به‌طور مستقیم از متابولیسم میکروبی و غیرمستقیم از واکنش بین اسیدهای چرب فرّار با بی‌کربنات حاصل می‌شود (۷). مقایسه داده‌های گاز تولیدی، متان و دی اکسیدکربن نشان می‌دهد که اسانس‌های گیاهی به‌علّت کاهش معنی‌دار متان، احتمالاً از طریق افزایش دی اکسیدکربن و اسیدهای چرب توانسته‌اند گاز تولیدی را افزایش دهند؛ زیرا در فرآیند ۹ مرحله‌ای تولید گاز متان، دی اکسید کربن با هیدروژن ترکیب شده و متان تولید می‌شود (۲۴). کاهش حجم گاز تولیدی در حضور گیاهان دارویی احتمالا مربوط به نقش ممانعت کنندگی اسانس در تولید گاز متان باشد. مک اینتاچ و همکاران (۲۰۰۳) اذعان داشتند که تولید گاز تجمعی و متان تولیدی در حضور اسانس‌ها در محیط کشت در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌یابد. از آنجایی‌که در این مطالعه گیاهان دارویی با تأثیر بر متانول‌ها توانسته‌اند حجم متان تولیدی را کاهش دهند (جدول ۴)، بنابراین سهم دی‌اکسید کربن باید افزایش یافته باشد؛ زیرا باکتری‌های تولید کننده متان از طریق واکنش $CO_2 + 4H_2CH \rightarrow 2+4HO_2$ باعث حذف هیدروژن و دی اکسید کربن از شکمبه می‌شوند (۸). در ضمن از آنجایی‌که کل گاز تولیدی در شکمبه شامل دی اکسید کربن، متان، ازت و هیدروژن است و به‌دلیل ثابت بودن میزان گازهای ازت و هیدروژن (به‌ترتیب ۷/۲ و ۰/۶ درصد)، بنابراین طبیعی است که با افزایش کل گاز تولیدی و کاهش متان باید سهم دی اکسیدکربن افزایش یافته باشد. همچنین تغییر در فعّالیت میکروبی مایع شکمبه‌ای ممکن است روی سرعت تخمیر تأثیر بگذارد (۱۱).

اثر گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها بر نیتروژن آمونیاکی و متان تولیدی

نتایج نشان داد درصد گاز متان نسبت به کل گاز تولیدي در تیمارهاي حاوي گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها کاهش یافته است (جدول ۴)، به‌طوری‌که استفاده از همه‌ی تیمارهای آزمایشی مقدار متان تولیدی را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش دادند (۴۲/۳۷ میلی‌گرم برای گرم ماده خشک مصرفی برای شاهد در مقابل ۴۰/۵۵، ۴۰/۶۱، ۳۹/۱۰ و ۴۰/۰۲ به‌ترتیب برای تیمارهای پودر آویشن، پودر رزماری، اسانس آویشن و اسانس رزماری). اگرچه میزان pH شکمبه تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (P>۰/۰۵) ولی استفاده از گیاهان داوریی و اسانس آن‌ها غلظت نیتروژن آمونیاکی را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش دادند (P<۰/۰۵). کاهش در مقدار متان تولیدی با افزودن گیاهان دارویی و اسانس‌های آن‌ها با نتایج حاصل از پژوهش‌های قبلی برون‌تنی (۱۳) انجام شده در گاو شیرده مطابق بود. این گیاهان به احتمال زیاد داراي ترکیباتي مؤثر براي کاهش متان بوده‌اند (۱۴). به عقیده بنچار و همکاران (۲۰۰۸) مواد مؤثر موجود در این گیاهان مي‌توانند از طریق اختلال در مکانیسم‌هاي انتقال الکترون، تغییر در غلظت یون‌هاي سلّولي، انتقال پروتئین، فسفریلاسیون و دیگر واکنش‌هاي آنزیمي سبب تخریب سلّول باکتري‌هاي متانوژن و همچنین تخریب سلّول پروتوزوآ و به‌دنبال آن کاهش هیدروژن تولیدي شوند (۵). آویشن دارای ترکیبات مؤثر تیمول، کارواکرول، روسیمن و گاماترپینن می‌باشد. تیمول و کارواکرول موجود در این گیاه به‌دلیل وجود گروه هیدروکسیل در ساختار فنولیک خود دارای اثرات گسترده ضدباکتریایی بر انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی

جدول ۴- اثر گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها بر pH، تولید متان و نیتروژن آمونیاکی بعد از ۲۴ ساعت کشت.

	فراسنجه هاي تخمير		
تیمار	متان (میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک)	pH	نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
شاهد	۴۳/۳۷ [a]	۶/۳۱	۴۳/۲۰ [a]
پودر آویشن	۴۰/۵۵ [b]	۶/۱۹	۳۸/۱۹ [b]
پودر رزماری	۴۰/۶۱ [b]	۶/۳۹	۳۸/۹۰ [b]
اسانس اویشن	۳۹/۱۰ [b]	۶/۲۰	۳۶/۴۵ [c]
اسانس رزماری	۴۰/۰۲ [b]	۶/۱۳	۳۷/۳۰ [bc]
میانگین خطای استاندارد*	۱/۰۱	۰/۲۴	۱/۱۹
سطح احتمال معنی‌داری**	۰/۰۲	۰/۵۱	۰/۰۱

وجودحروف‌غیرمشترک در هرستون‌نشان‌دهنده‌تفاوت‌معنی‌دار در مقایسه باتیمارشاهد است (p<۰/۰۵)

*SEM**p-value

می‌باشد (۴). ترکیبات فنولیک دیواره سلّول را مورد هدف قرار داده و بنابراین روی ساختار دیواره سلّولی تأثیر می‌گذارند.
کاهش غلظت آمونیاک در تیمارهای حاوی گیاهان دارویی در مقایسه با خوراک پایه احتمالاً به‌دلیل مهار باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین توسط مواد مؤثر موجود در گیاهان دارویی و در نتیجه کاهش تجزیه پروتئین میکروبی در شکمبه (۱)، و یا اثر منفی مواد مؤثر موجود در گیاهان دارویی بر باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک با توان تولید بالا باشد که موجب کاهش تولید آمونیاک در شکمبه می‌شود. مک اینتاش و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان کردند که مخلوط اسانس‌ها منجر به جلوگیری از دآمینه شدن اسیدهای آمینه شده و در نتیجه غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه کاهش می‌یابد. همچنین مطالعات کاستیلجوس و همکاران در سال ۲۰۰۸ تاییدی بر کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزودن اسانس‌های مخلوط و در نتیجه افزایش سنتز پروتئین میکروبی بود.

اثر گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها بر غلظت اسیدهای چرب فرّار

تغییرات غلظت اسیدهای چرب فرّار پس از ۲۴ ساعت کشت در جدول ۵ نشان داده شده است. غلظت پروپیونات و نسبت استات به پروپیونات به‌طور معنی‌دار تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت ($P<0/05$). استفاده از اسانس‌های آویشن و رزماری در مقایسه با تیمار شاهد میزان پروپیونات را افزایش و نسبت استات به پروپیونات را کاهش داد ($P<0/05$)، اگرچه تفاوت اسانس و پودر گیاهان دارویی در این فراسنجه‌ها معنی‌دار نبود. استفاده از اسانس‌های گیاهی در مقایسه با تیمارهای شاهد و پودر گیاهان دارویی غلظت اسیدهای چرب فرّار کل تولیدی بعد از ۲۴ ساعت کشت را به‌طور معنی‌داری افزاش داد ($P<0/05$). نتایج متفاوتی از تأثیر اسانس‌های گیاهی بر اسیدهای چرب فرّار شکمبه گاو شیری وجود دارد. برخی گزارشات عدم تأثیر (۲۲) و برخی پژوهش‌ها کاهش میزان اسیدهای چرب فرّار (۱ و ۱۹) به‌خصوص در موارد استفاده از دُزهای بالای این ترکیبات در جیره را گزارش نمودند. افزایش میزان اسیدهای چرب فرّار به‌هنگام استفاده از اسانس‌های گیاهی می‌تواند نشانگر بهبود استفاده از مواد مغذّی توسط حیوان باشد. از مکانیسم‌های شناخته شده‌ای که طی آن نسبت اسیدهای چرب فرّار به‌طور غیر مستقیم تحت تأثیر قرار می‌گیرد، افزایش میزان گاز هیدروژن به‌دلیل مهار آن توسط مسیرهای تولید متان و باقی‌ماندن این پیش ماده ساخت متان در محیط تخمیر می‌باشد (۱۲)؛ بنابراین هرچه واکنش‌های تولید متان شکمبه کمتر گردد، تولید اسید پروپیونیک بیشتر می‌شود.

اثر گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها بر قابلیت هضم مواد مغذی

نتایج مربوط به اثر افزودن گیاهان دارویی آویشن، رزماری و اسانس‌های آن‌ها بر قابلیت هضم ظاهری ماده خشک در ساعت ۲۴ کشت و قابلیت هضم ظاهری ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در ساعت‌های ۱۶ و ۲۴ کشت در جدول ۶ آورده شده است. قابلیت هضم ظاهری ماده خشک بعد از ۲۴ ساعت کشت به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت ($P<0/05$)، به‌طوری که بالاترین قابلیت هضم در تیمار اسانس آویشن مشاهده گردیدکه تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشت ($P<0/05$). کمترین قابلیت هضم ماده خشک نیز در تیمار شاهد مشاهده گردید و اگرچه در مقایسه با تیمارهای پودر آویشن و رزماری و اسانس رزماری معنی‌دار نبود ولی به‌طور عددی کمتر بود. قابلیت هضم ظاهری ماده آلی در هر دو ساعت ۱۶ و ۲۴ کشت تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت. به‌طوری که در ساعت ۱۶ تیمارهای اسانس آویشن و رزماری باعث افزایش هضم ظاهری ماده آلی شدند، امّا در ساعت ۲۴ کشت تمامی تیمارها سبب افزایش معنی‌دار قابلیت هضم ظاهری ماده آلی در مقایسه با شاهد شد (۸۳/۱۲ برای تیمار شاهد در مقابل ۸۴/۱۳، ۸۴/۴۱، ۸۵/۹۰ و ۸۴/۱۹ به‌ترتیب برای تیمارهای آویشن، رزماری، اسانس آویشن و اسانس رزماری).

جدول ۵- اثر گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها بر اسیدهای چرب فرّار شکمبه بعد از ۲۴ ساعت کشت.

تیمار	کل	استات	پروپیونات	بوتیرات	استات/پروپیونات
شاهد	۸۴/۳۳ ^{b}	۶۷/۳۳	۲۳/۳۸ ^{b}	۱۳/۴۳	۲/۸۸ ^{a}
پودر آویشن	۸۵/۶۷ ^{b}	۷۲/۷۳	۲۹/۰۹ ^{a}	۱۲/۰۹	۲/۵۰ ^{b}
پودر رزماری	۸۶/۲۰ ^{b}	۷۲/۶۲	۳۰/۰۱ ^{a}	۱۲/۴۳	۲/۴۲ ^{b}
اسانس اویشن	۹۰/۱۳ ^{a}	۷۲/۶۹	۳۱/۲۰ ^{a}	۱۳/۲۰	۲/۳۳ ^{b}
اسانس رزماری	۸۹/۹۴ ^{a}	۷۵/۴۸	۳۱/۴۵ ^{a}	۱۳/۸۷	۲/۴۰ ^{b}
میانگین خطای استاندارد*	۱/۱۳	۲/۱۱	۱/۴۵	۱/۱۲	۰/۱۰
سطح احتمال معنی‌داری**	۰/۰۴	۰/۳۴	۰/۰۱	۰/۳۶	۰/۰۵

وجودحروف‌غیرمشترک در هرستون‌نشان‌دهنده‌تفاوت معنی‌دار در مقایسه با تیمارشاهد است ($p<0/05$)

*SEM**p-value

افزایش یا کاهش در قابلیت هضم ماده خشک یا مواد مغذّی توسط گیاهان دارویی به دُز استفاده از آن‌ها در جیره بستگی دارد که ممکن است منجر به افزایش و یا مهار جمعیت باکتریایی شکمبه شود. در آزمایشی الکساندر و همکاران (۲۰۰۸) نشان‌دادند که افزودن ۲ میلی‌گرم در لیتر از عصاره گیاهی قابلیت هضم آزمایشگاهی ماده آلی را در مقایسه با شاهد افزایش می‌دهد (۲). تفاوت در نتایج می‌تواند به‌علّت جیره، ترکیبات شیمیایی و دُز متفاوت استفاده شده در آزمایشات باشد (۱۰).

نتیجه‌گیری کلی

از آنجا که تغییر در تخمیر شکمبه به جهت کاهش متان می‌تواند بازدهی استفاده از انرژی در شکمبه را افزایش دهد، لذا استفاده از اسانس‌های رزماری و آویشن در خوراک دام پیشنهاد می‌گردد که متعاقبا بهبود عملکرد حیوان را در برخواهد داشت. البته با توجه به قیمت گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها توصیه می‌شود آزمایشات تکمیلی بیشتری روی گاو شیری برای محاسبه بازده اقتصادی این گیاهان نیز صورت گیرد.

پاورقی‌ها

1- Clevenger apparatus.

1- Rubber stopper.

منابع مورد استفاده

1- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C. and D. N. Kamra. 2009. Effect of peppermint (Mentha piperita) oil on In vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. Animal Feed Science and Technology, 148(2), PP:321-327.

2- Alexander, G., Singh, B., Sahoo, A. and T. K. Bhat. 2008. In vitro Screening of Plant Extracts to Enhance the Efficiency of Utilization of Energy and Nitrogen in Ruminant Diets. *Animal Feed Science and Technology*, 145: PP: 229-244.

3- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

4- Benchaar, C., and H. Greathead. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166,PP: 338-355.

5- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., K. A. Beauchemin. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145, PP: 209–228.

6- Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Chiquette, J. And P. Y. Chouinard. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science*, 90, PP: 886–897.

جدول ۶- اثر گیاهان دارویی و اسانس آن‌ها بر قابلیت هضم ظاهری مواد مغذّی در ساعت‌های ۱۶ و ۲۴ کشت.

	فراسنجه هاي تخمير						
	DMD	OMD		SCFA		ME	
تیمار	ساعت ۲۴	ساعت ۱۶	ساعت ۲۴	ساعت ۱۶	ساعت ۲۴	ساعت ۱۶	ساعت ۲۴
شاهد	۸۲/۱۳ b	۷۴/۱۹ b	۸۳/۱۳ b	۴۹/۳۲	۵۶/۳۰	۱۱/۱۲	۱۵/۱۶
پودر آویشن	۸۲/۹۰ b	۷۴/۶۹ b	۸۴/۱۳ a	۴۸/۳۰	۵۶/۸۷	۱۱/۴۳	۱۵/۹۴
پودر رزماری	۸۳/۱۰ b	۷۴/۹۰ b	۸۴/۴۱ a	۴۹/۱۲	۵۵/۴۰	۱۱/۸۸	۱۵/۴۰
اسانس اویشن	۸۵/۱۲ a	۷۷/۷۰ a	۸۵/۹۰ a	۴۸/۹۰	۵۶/۱۹	۱۳/۴۰	۱۶/۱۰
اسانس رزماری	۸۳/۴۳ b	۷۶/۳۰ a	۸۴/۱۹ a	۴۹/۰۵	۵۶/۱۲	۱۳/۵۶	۱۶/۰۲
میانگین خطای استاندارد*	۰/۹۸	۰/۸۲	۰/۴۹	۰/۷۰	۰/۸۹	۰/۶۶	۰/۹۲
سطح احتمال معنی-داری**	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۵۲	۰/۶۷	۰/۰۴	۰/۴۰

وجودحروف‌غیرمشترک در هرستون‌نشان‌دهنده‌تفاوت معنی‌دار در مقایسه با تیمارشاهد است (p<۰/۰۵)

*SEM **p-value

DMD= قابلیت هضم ماده خشک (درصد)،OMD= قابلیت هضم ماده آلی (درصد)، ME= انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک) ، SCFA غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول بر ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک).

7- Beuvink, J. M. W. and S. F. Spoelstra. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms invitro. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(4),PP: 505-509.

8- Blummel, M., and E. R. Orskov. 1994. Comparison of gas production and nylon bagdegradabilityof roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40,PP: 109-119.

9- Briskin, D. P., 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Healt. *Plant Physiology*, 124, PP: 507-514.

10- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., and C. Kamel. 2006. Plant extracts affect In vitro rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 89, PP: 761-771.

11- Castillejos, L., S. Calsamiglia, J. Martín-Ereso, and H. Ter Wijlen. 2008. In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science and Technology*, 145, PP: 259-270.

12- Clevenger, J. F., 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association*, 17, PP: 345–349.

13- Denek, N., Aydin, S. S., and A. Can. 2017. The effects of dried pistachio (Pistachio vera L.) by-product addition on corn silage fermentation and in vitro methane production. *Journal of Applied Animal Research*, 45,PP: 185–189.

14- Garcia-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M., and J. S. Gonzalez. 2005. Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). In: Soliva, C. R., Takahashi, J., Kreuzer, M. (Eds.), Proceedings of the 2nd International Conference of Greenhouse Gases and Animal Agriculture. ETH Zurich, Zurich, Switzerland, Pp. 444–447

15- Gunun, P., Gunun, N., Cherdthong, A., Wanapat, M., Polyorach, S., Sirilaophaisan, S., Wachirapakorn, C., and S. Kang. 2018. In vitrorumen fermentation and methane production as affected by rambutan peel powder. *Journal of Applied Animal Research,* 4(1),PP: 626-631.

16- Hess, H. D., Kreuzer, M., Diaz, T. E., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Soliva, C. R., and A. Machmuller. 2003. Saponin rich tropical fruits affect ferment ation and methanogenesis in faunated and de faunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109,PP: 79-94.

17- Jahani-Azizabadi, H., Danesh Mesgaran, M., Vakili, A., and K. Rezayazdi. 2014. Effect of some plant essential oils on in vitro ruminal methane production and on fermentation characteristics of a mid-forage diet. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 16,PP: 1543-1554.

18- Johnson, K.A., and D.E. Johnson. 1995. Methane emission from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, PP: 2483-2492.

19- Kumar, S. A, Mohan, M. E, Gandhimathi, R., and Amudha, P., 2009. Study on the Anti-Seizure Activity of Methanolic Extracts of Indigofera Tinctoria (L.). *Pharmacologyonline*, 1,PP: 1341-1351.

20- Macheboeuf, D., Morgavi, D. P. Papon, Y., Mousset, J. L. and M. Arturo-Schaan. 2008. Dose-response effects of essential oils on In vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Animal Feed Science and Technology*, 145,PP; 335-350.

21- Makkar, H. P. S., 2005. In vitro gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology*, 124PP: 291-302.

22- Malecky, M., Broudiscou, L. P., and P. Schmidely. 2009. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. Animal Feed Science and Technology, 154,PP: 24-35.

23- McDonald, I., 1981. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science*, 96,PP: 251-252.

24- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D.A. and C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, PP: 5011– 5014.

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