

Original Article

Application of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. essential oil in ruminant nutrition: Improvement of energy efficiency and reduction of Ruminant Methane in an *in Vitro* model

Mohsen Kazemi^{*1} , Hassan Saleh^{2,3} 

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Animal Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran

2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Saravan, Saravan, Sistan and Baluchestan, Iran

3. Faculty of Agriculture, University of Torbat Heydaryeh, Torbat Heydaryeh, Iran

Submitted: 2025.12.18

Accepted: 2026.01.18

Revised: 2026.01.16

Published: 2026.07.01

* Corresponding author: m.kazemi@tjamcaas.ac.ir ; phd1388@gmail.com

Ab tract

Introduction: Plant essential oils, as natural feed additives, can improve fermentation efficiency and reduce methane production by modulating the rumen microbial population. *Pulicaria gnaphalodes* (PG), known for its diverse bioactive compounds, has considerable potential for use in ruminant nutrition. **Objectives:** This study was conducted to determine the chemical composition of PG essential oil and investigate the effects of different inclusion levels on ruminal fermentation parameters, gas production, and methane yield under *in vitro* conditions. **Methods:** The essential oil was extracted by hydrodistillation, and its constituents were identified by GC/MS. *In vitro* fermentation was conducted using rumen fluid obtained from three fistulated male sheep and a basal diet. Treatments consisted of five levels of the essential oil (0, 250, 500, 750, and 1000 mg/L of incubation medium). Parameters including gas production, methane emission, pro-tozoal count, volatile fatty acids, ammonia nitrogen, pH, nutrient degradability, and microbial indices were measured over 24 to 96 hours of incubation. Data were analyzed using a completely randomized design. **Results:** The essential oil of PG primarily contained 1,8-cineole (16.50%), eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol and α-terpineol (12.20%). Essential oil supplementation resulted in a significant linear decrease in (13.70%) methane production (from 13.25 to 8.02 mL), protozoal population (from 7.27 to 4.29×10^5 cells/mL), ammonia nitrogen (from 18.01 to 13.86 mg/dL), and dry matter degradability (from 70.75% to 63.95%) ($P < 0.05$). However, microbial biomass synthesis efficiency (from 24.90% to 30.42%) and the partitioning factor (from < 2.93 to 3.16 mg of truly digested organic matter/mL of gas produced) increased significantly ($P < 0.05$). The highest microbial biomass (55.63 mg) was observed at the 500 mg/L concentration ($P < 0.05$). **Conclusion:** PG essential oil enhanced rumen efficiency by reducing protozoal populations and methane production. The 500 mg/L dose appears to be optimal for improving microbial activity in fattening lambs.

Keywords: *Pulicaria gnaphalodes*, Essential oil, Ruminant fermentation, Methane mitigation
Microbial efficiency



Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by [Razi Vaccine & Serum Research Institute](#) This article is an open access article licensed under the [Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](#)

کاربرد اسانس علف هیضه (*Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss) در تغذیه نشخوارکنندگان: بهبود کارآیی انرژی و کاهش متان شکمبه‌ای در یک مدل آزمایشگاهی

محسن کاظمی^{۱*}؛ حسن صالح^{۲،۳}

۱. گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی تربت جام، تربت جام، ایران

۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه سراوان

۳. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربت حیدریه، تربت حیدریه، خراسان رضوی، ایران



تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۰/۲۶ تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۴/۰۱

* نویسنده مسئول: phd1388@gmail.com ؛ m.kazemi@tjamcaas.ac.ir

چکیده

مقدمه: اسانس‌های گیاهی، به‌عنوان افزودنی‌های طبیعی، با تعدیل جمعیت میکروبی شکمبه می‌توانند کارآیی تخمیر و تولید متان را بهبود بخشند. گیاه علف هیضه (*Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss) با ترکیبات زیست‌فعال متنوع، پتانسیل استفاده در تغذیه نشخوارکنندگان را داراست. **هدف:** این پژوهش با هدف تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس علف هیضه و بررسی اثر سطوح مختلف آن بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، تولید گاز و متان در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. **روش کار:** اسانس گیاه به‌روش تقطیر با آب استخراج و ترکیبات آن با GC/MS شناسایی شد. آزمایش برون‌تنی با استفاده از مایع شکمبه سه رأس گوسفند نر فیس‌توله‌شده و جیره پایه انجام شد. تیمارها شامل پنج سطح اسانس (۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر محیط کشت) بودند. فراسنجه‌های تولید گاز، متان، جمعیت پروتوزوا، اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی، pH، تجزیه‌پذیری مواد مغذی و شاخص‌های میکروبی طی ۲۴ تا ۹۶ ساعت انکوباسیون اندازه‌گیری شدند. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز شدند. **نتایج:** اسانس علف هیضه حاوی ۸۰-۱۶۵۰ سینئول (درصد)، اتودسما-۴ (۱۵)، ۷-دین-۱-بتا-اول (۱۳/۷۰ درصد) و آلفا-ترپینئول (۱۲/۲۰ درصد) به‌عنوان ترکیبات اصلی بود. افزودن اسانس سبب کاهش خطی معنی‌دار تولید متان (از ۱۳/۲۵ به ۸/۰۲ میلی‌لیتر)، جمعیت پروتوزوا (از ۷/۲۷ به ۴/۲۹ × ۱۰^۵ سلول/میلی‌لیتر)، نیتروژن آمونیاکی (از ۱۸/۰۱ به ۱۳/۸۶ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) و تجزیه‌پذیری ماده خشک (از ۷۰/۷۵ به ۶۳/۹۵ درصد) شد (P<۰/۰۵). با این وجود، راندمان سنتز توده میکروبی (از ۲۴/۹۰ به ۳۰/۴۲ درصد) و ضریب تفکیک‌پذیری (از ۲/۹۳ به ۳/۱۶ میلی‌گرم ماده آلی حقیقی هضم شده/میلی‌لیتر گاز تولید شده) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). بیشترین توده میکروبی تولیدی (۵۵/۶۳ میلی‌گرم) در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (P<۰/۰۵). **نتیجه‌گیری کلی:** اسانس علف هیضه با کاهش جمعیت پروتوزوا و تولید متان، کارآیی تخمیر شکمبه‌ای را بهبود بخشید. غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس می‌تواند به‌عنوان سطح بهینه برای بهبود عملکرد میکروبی شکمبه در جیره بره‌های پرواری مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: علف هیضه، اسانس گیاهی، تخمیر شکمبه‌ای، مهار متان، کارآیی میکروبی

مقدمه

اسانس‌های گیاهی به‌عنوان ترکیباتی طبیعی و فرا، به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی و تعدیل‌کنندگی جمعیت میکروبی شکمبه، مورد توجه متخصصین تغذیه نشخوارکنندگان قرار گرفته‌اند (۱-۴). این ترکیبات می‌توانند با مهار انتخابی آرکنا‌های متانوزن و پروتوزوآها، مسیر تخمیر شکمبه را به سمت تولید بیشتر پروپیونات هدایت کرده و در نتیجه، بازده انرژی خوراک را افزایش و تولید گاز متان را کاهش دهند (۵-۸).

گیاه علف هیضه (*Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss) از تیره *Asteraceae*، یکی از گیاهان بومی مناطق خشک ایران است. گزارش‌ها حاکی از حضور ترکیبات زیست‌فعال مهمی نظیر ۱،۸-سینئول و آلفا-ترپینئول در اسانس این گیاه است (۹ و ۱۰). این ترکیبات که به‌خاطر اثرات ضد میکروبی و ضد پروتوزوآیی شناخته شده‌اند (۱۱)، پتانسیل استفاده به‌عنوان یک افزودنی طبیعی در جیره نشخوارکنندگان را دارند. با این وجود، تاکنون اثرات اسانس این گیاه خاص بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای و تولید متان به‌طور مستقیم مورد بررسی قرار نگرفته است.

با توجه به نیاز مبرم به یافتن راهکارهای طبیعی برای کاهش انتشار متان (به‌عنوان یک گاز گلخانه‌ای قوی) و بهبود کارایی تغذیه در نشخوارکنندگان، انجام پژوهشی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، هدف از این مطالعه، تعیین ترکیب شیمیایی اسانس گیاه علف هیضه و بررسی اثر سطوح مختلف آن بر تولید گاز و متان، فراسنجه‌های تخمیری، جمعیت پروتوزوآیی و کارایی سنتز میکروبی در یک سیستم آزمایشگاهی *in vitro* بود.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و استخراج اسانس

پیکره‌های هوایی گیاه علف هیضه (*Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss) در اوج مرحله گلدهی و در اواخر شهریورماه سال ۱۴۰۳ از بخش کوهپایه‌ای روستای رونج واقع در شهرستان تربت‌جام جمع‌آوری شدند. این روستا در مختصات جغرافیایی ۳۵°۱۸'۲۲" شمالی و ۶۰°۱۹'۴۱" شرقی و

در ارتفاع ۱۳۲۵ متر از سطح دریا واقع شده است. خاک منطقه عمدتاً رسی-لومی است. نمونه‌های گیاهی بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافته و در دمای کنترل‌شده ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت (تا رسیدن به وزن ثابت) در آون خشک شدند. پس از فرآیند خشک‌شدن، کلیه اندام‌های گیاه (شامل ساقه، برگ و گل) با کمک آسیاب مکانیکی به ذراتی با ابعاد حدود ۲ میلی‌متر تبدیل شدند. استخراج اسانس به شیوه تقطیر با بخار آب و با کاربرد دستگاه کلونجر انجام شد (۴). اسانس استخراج‌شده با استفاده از سولفات سدیم بی‌آب خشک شد و محصول نهایی در ویال‌های شیشه‌ای تیره‌رنگ نگهداری و تا زمان انجام مراحل آنالیزی، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد داخل یخچال ذخیره شد. بازده اسانس از طریق فرمول زیر محاسبه شد (۹).

$$\text{وزن اسانس} \times 100 = \frac{\text{وزن خشک گیاه}}{\text{بازده اسانس (درصد)}}$$

تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس

برای شناسایی و کمی‌سازی ترکیبات فرار موجود در اسانس استخراج‌شده از گیاه، از دو سیستم کروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography: GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (Gas Chromatography/MS) استفاده شد. آنالیز GC با استفاده از دستگاه Agilent Technologies مدل ۷۸۹۰A انجام شد. ستون کاپیلاری مورد استفاده از نوع HP-5MS (30m × 0.25 mm × 0.25 μm) بود. برنامه دمایی به‌صورت افزایش تدریجی (رمپ افزایشی) تنظیم شد: دمای اولیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه نگه‌داری شد، سپس با نرخ ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا ۲۱۰ درجه افزایش یافت و در ادامه با نرخ ۲۰ درجه در دقیقه به ۲۴۰ درجه رسید و به مدت ۵/۸ دقیقه در این دما تثبیت گردید. دمای اینژکتور ۲۴۰ درجه و دمای آشکارساز FID برابر با ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.

آنالیز GC/MS نیز با استفاده از دستگاه Agilent Technologies مدل ۵۹۷۵C انجام شد. شرایط عملیاتی شامل دمای اینژکتور ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت و گاز حامل هلیوم با جریان ۱ میلی‌لیتر در

تهیه جیره پایه و مایع شکمبه

جیره غذایی مورد استفاده در محیط کشت، بر مبنای نیازهای تغذیه‌ای یک گوسفند نر نژاد بلوچی با میانگین سن پنج ماه و وزن تقریبی ۴۰ کیلوگرم تنظیم گردید (۱۲). فهرست مواد تشکیل‌دهنده و آنالیز شیمیایی جیره غذایی (پایه) به کاررفته در مطالعه تخمیر شکمبه‌ای آزمایشگاهی در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

دقیقه بود. شناسایی ترکیبات بر اساس مقایسه طیف جرمی با کتابخانه‌های NIST و WILEY، محاسبه شاخص بازداری (Retention Index: RI) نسبت به آلکان‌های استاندارد (C_۸-C_{۲۴}) و تطابق با داده‌های مرجع انجام شد. در نهایت، درصد کمی هر ترکیب بر اساس مساحت زیر منحنی کروماتوگرافی (روش نرمال‌سازی مساحت) و بدون استفاده از فاکتورهای اصلاح پاسخ محاسبه گردید.

جدول ۱: فهرست مواد تشکیل‌دهنده و آنالیز شیمیایی جیره غذایی (پایه) به کاررفته در مطالعه

تخمیر شکمبه‌ای در مدل آزمایشگاهی

اقلام	مقدار در جیره (درصدی از ماده خشک)
یونجه خشک	۱۷
کاه بقولات (لوبیا و عدس)	۴
دانه جو	۲۵
دانه ذرت	۲۵
کنجاله کلزا	۵
سبوس گندم	۵
تفاله چغندر قند	۵
کنجاله سویا	۸
اکسید منگنز	۱/۵
مکمل ویتامینی- معدنی ^۱	۲
نمک	۱/۵
آهک	۱
ترکیبات شیمیایی (درصدی از ماده خشک)	
ماده خشک	۹۱/۷
انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری/کیلوگرم ماده خشک)	۲/۶۹
خاکستر	۹/۲
چربی خام	۲/۵
کربوهیدرات‌های غیر فیبری	۴۹
پروتئین خام	۱۴/۳
کلسیم	۰/۸۵
فسفر	۰/۳۶

۱- حاوی ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_۳، ۸۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۰/۸ گرم مونسین ۱۰ درصد، ۰/۴ گرم آهن و ۷۴ گرم کلسیم، ۱۵/۶ گرم سدیم، ۱ گرم منگنز، ۸ میلی‌گرم کبالت، ۶ میلی‌گرم سلنیوم، ۳۰ میلی‌گرم ید، ۲ گرم روی، ۱ گرم آهن و ۰/۱۵ گرم مس.

یافت تا فشار داخل سیستم به صفر برسد. در ادامه، حجم گاز مستقیماً از روی درجه‌بندی سرنگ خوانده و ثبت شد. درپوش هر بطری از سرنگ جدا شده و بطری‌ها مجدداً برای ادامه دوره انکوباسیون به حمام آب بازگردانده شدند (۴). در نهایت، منحنی تولید گاز با استفاده از مدل غیرخطی $Y=b(1-ct^c)$ برازش داده شد که در آن Y حجم گاز تولیدشده در زمان t ، b پتانسیل حداکثری تولید گاز (میلی‌لیتر) و c نرخ تولید گاز (h^{-1}) است (۱۵).

اندازه‌گیری‌های پس از دوره کشت

پس از پایان دوره ۲۴ ساعته انکوباسیون، pH محتوای هر فلاسک بلافاصله اندازه‌گیری گردید. نمونه‌ها از پارچه پلی‌استری با اندازه منافذ ۴۵ میکرون عبور داده شدند. بخش جامد باقیمانده برای تعیین قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی به کروزه‌های از پیش توزین‌شده منتقل شد. برای محاسبه قابلیت هضم ماده آلی، نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. همچنین، برای برآورد قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی، نمونه‌های فیلترشده و خشک‌شده در محلول شوینده خنثی شستشو داده شده و بر اساس روابط استاندارد، میزان هضم آن‌ها محاسبه شد (۱۶). برای تعیین قابلیت هضم مواد مغذی، از فلاسک‌های آزمون تولید گاز به‌صورت مجزا استفاده گردید.

غلظت کل اسیدهای چرب فرار (Total volatile fatty acids: TVFA) با استفاده از روش تقطیر مارخام تعیین شد (۱۷). به‌طور خلاصه، ۲ میلی‌لیتر از هر نمونه کشت پس از پایان دوره انکوباسیون برداشته شد و به دستگاه تقطیر میکروکجدال مارخام منتقل گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر بافر اگزالات (اگزالاتیک اسید/پتاسیم اگزالات) به نمونه اضافه و تقطیر انجام شد. حدود ۸۰ میلی‌لیتر از محلول تقطیرشده جمع‌آوری و با استفاده از هیدروکسید باریم ۰/۰۲ نرمال در حضور شناساگر فنل‌فتالئین تیترو گردید.

مقدار TVFA با در نظر گرفتن تیترو نمونه شاهد (بدون اسانس) محاسبه شد (۱۷).

برای تعیین حجم گاز متان، در پایان دوره ۲۴ ساعته انکوباسیون، ۴ میلی‌لیتر محلول سود ۱۰ مولار به داخل فلاسک‌ها تزریق شد تا دی‌اکسیدکربن جذب شده و حجم

مایع شکمبه مورد نیاز از سه رأس گوسفند نر بالغ نژاد بلوچی (با وزن 30 ± 5 کیلوگرم) که مجهز به فیستولای دائم شکمبه‌ای بودند، گرفته شد. جیره نگهداری این دام‌ها ترکیبی از کاه گندم (۲۰۰ گرم در روز) و کنسانتره تجاری (شامل ۵۰ درصد جو آسیاب‌شده، ۲۵ درصد سبوس گندم، ۲۰ درصد کنجاله سویا، ۳ درصد سنگ آهک، ۱ درصد مکمل ویتامینی-مینرالی و ۱ درصد نمک) به میزان ۳۰۰ گرم در روز، با چگالی انرژی معادل ۱۰/۱۵ مگاژول در هر کیلوگرم ماده خشک بود.

ارزیابی تولید گاز و قابلیت تجزیه‌پذیری مواد مغذی

محیط کشت مورد استفاده در آزمون تولید گاز، با نسبت ۲ به ۱ از محلول بزاق مصنوعی و مایع شکمبه تهیه شد (۱۳). در هر یک از بطری‌های شیشه‌ای ۱۲۰ میلی‌لیتری، مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم (بر پایه ماده خشک) از خوراک آسیاب‌شده (مطابق جدول ۱، با اندازه ذرات ۱ میلی‌متر) همراه با مقادیر متفاوت اسانس علف هیضه (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر محیط کشت) اضافه گردید. سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان حداکثر غلظت بررسی شده و با هدف تعیین دامنه اثر و احتمال سمیت یا اثرات مهایر شدید بر میکروفلور شکمبه، بر اساس مطالعات مشابه انجام‌شده بر روی سایر اسانس‌های گیاهی انتخاب شد. برای هر یک از سطوح آزمایشی، چهار تکرار در نظر گرفته شد.

پس از تزریق ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت، فلاسک‌ها با درپوش‌های لاستیکی مجهز به درپوش آلومینیومی مسدود شده و به‌مدت ۹۶ ساعت در حمام آب با دمای ثابت ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. میزان فشار و حجم گاز تولیدی در بازه‌های زمانی ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از شروع انکوباسیون، با به‌کارگیری روش تئودورو و همکاران (۱۴) اندازه‌گیری و ثبت گردید.

به‌طور خلاصه، در زمان‌های تعیین‌شده، فشار درون هر فلاسک از طریق اتصال یک فشارسنج دیجیتالی به وسیله سوزن‌های تعبیه‌شده در درپوش، قرائت شد. سپس هر بطری به یک سرنگ مدرج (که پیستون آن از پیش در موقعیت صفر تنظیم شده بود) متصل گردید. با کشیدن آرام پیستون، کل گاز تولیدشده از بطری به داخل سرنگ انتقال

جدول ۲: ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس گیاه علف هیضه				
ردیف	ترکیب شیمیایی، اسم فارسی	ترکیب شیمیایی، اسم لاتین	مقدار، W/W، (درصد)	شاخص بازداری
۱	آلفا-پینن	α -Pinene	۷/۵۰	۹۳۲
۲	بتا-پینن	β -Pinene	۰/۱۵	۹۷۶
۳	دهیدور-۸و۱ سینئول	Dehydro-1,8-Cineole	۰/۷۰	۹۹۵
۴	آلفا-ترپینن	α -Terpinene	۰/۲۰	۱۰۱۶
۵	پارا-سیمن	p-Cymene	۲/۳۰	۱۰۲۶
۶	۸و۱-سینئول	1,8-Cineole	۱۶/۵۰	۱۰۳۲
۷	گاما-ترپینن	γ -Terpinene	۲/۴۰	۱۰۵۹
۸	لینالول	Linalool	۱/۱۰	۱۰۹۷
۹	کریزانتنون	Chrysanthenone	۱/۴۰	۱۱۲۶
۱۰	سیس-کریزانت	Cis-chrysanthanol	۱	۱۱۵۹
۱۱	ترپینن-۴-اول	Terpinen-4-ol	۵/۱۰	۱۱۷۹
۱۲	آلفا-ترپینئول	α -Terpineol	۱۲/۲۰	۱۱۹۶
۱۳	میرتنول	Myrtenol	۴/۱۰	۱۲۰۰
۱۴	ترانس-کاروئول	Trans-Carveol	۰/۱۵	۱۲۱۸
۱۵	نرول	Nerol	۱/۵۰	۱۲۲۸
۱۶	نرال	Neral	۰/۹۰	۱۲۳۹
۱۷	ژرانیول	Geraniol	۱/۹۰	۱۲۶۲
۱۸	تیمول	Thymol	۱/۹۰	۱۲۹۰
۱۹	متیل اوژنول	Methyl eugenol	۰/۶۰	۱۴۰۴
۲۰	آلفا-آمورفن	α -amorphphen	۰/۴۰	۱۴۸۸
۲۱	گاما-کادینن	γ -Cadinene	۰/۹۰	۱۵۱۴
۲۲	دلتا-کادینن	δ -Cadinene	۱/۴۰	۱۵۲۳
۲۳	آلفا-کادینن	α -cadinene	۱/۸۰	۱۵۳۹
۲۴	ژرماکرن دی-۴-اول	Germacrene D-4-ol	۰/۵۰	۱۵۷۴
۲۵	کاربوفیلا-۴(۱۴)، ۸(۱۵)دین-۵بتا-او	Caryophylla-4(14),8(15)-dien-5 β -ol	۹/۵۰	۱۶۴۶
۲۶	خوسینول	Khusinol	۱/۱۰	۱۶۷۰
۲۷	کادالن	Cadalene	۱	۱۶۸۹
۲۸	اوندسما-۴(۱۵)، ۷-دین-۱-بتا-اول	Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol	۱۳/۷۰	۱۶۹۴
۲۹	آمورفا-۴،۹-دین-۲-اول	Amorpha-4,9-dien-2-ol	۲/۱۰	۱۷۰۸
۳۰	۱۴-هیدروکسی- آلفا-هومولن	14-Hydroxy- α -humulene	۰/۹	۱۷۱۱
۳۱	(زد)-نوسیفرال	(Z)-nuciferol	۰/۶۰	۱۷۱۹
۳۲	(ای)-نوسیفرال	(E)-nuciferal	۰/۸۰	۱۷۲۵
۳۳	کورکومنول	Curcumenol	۱/۴	۱۷۴۰

گاز باقی‌مانده به‌عنوان متان در نظر گرفته شود (۱۸).

برای سنجش نیتروژن آمونیاکی، ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت صاف‌شده با ۵ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۰/۲ نرمال مخلوط و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آنالیز به روش کج‌لدال نگهداری شد (۱۹).

برآورد شاخص‌های مربوط به فعالیت میکروبی

ضریب تفکیک‌پذیری (Partitioning Factor یا PF) از رابطه ۱ (۲۰ و ۲۱) و بازده تولید توده میکروبی (Microbial Mass Yield یا MMY) از رابطه ۲ (۲۰) محاسبه شدند. در این روابط، a وزن ماده خشک هضم‌نشده، b وزن خاکستر بخش هضم‌نشده، c وزن ماده آلی اولیه (پیش از انکوباسیون) و IVGP حجم خالص گاز تولیدی در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

$$\text{رابطه ۱ } PF = [c - (a - b)] / IVGP$$

$$\text{رابطه ۲ } MMY = [c - (a - b)] - (IVGP \times 2.2)$$

بازده سنتز میکروبی (بر حسب درصد) از تقسیم MMY بر ماده آلی واقعاً هضم‌شده به دست آمد.

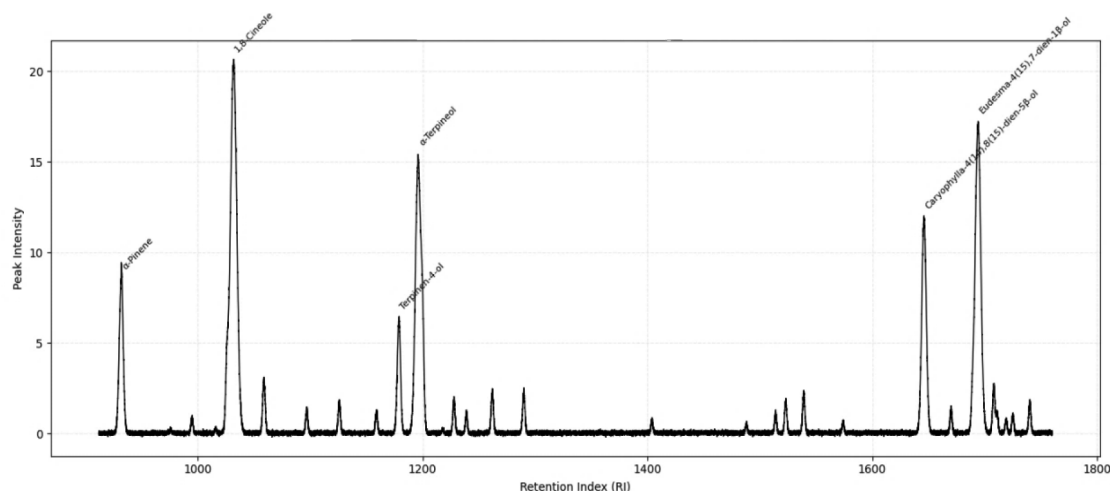
برای شمارش کل پروتوزوآها، ۵ میلی‌لیتر از مایع شکمبه با ۵ میلی‌لیتر فرمالین ۵۰ درصد و چند قطره رنگ بریلیانت گرین مخلوط و پس از ۲۴ ساعت، با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری، شمارش انجام گرفت (۲۲).

تحلیل‌های آماری

داده‌ها در چارچوب طرح کاملاً تصادفی و با بهره‌گیری از نرم‌افزار SAS ویرایش ۹/۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌های تیمارها با استفاده از آزمون توکی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

بازده تولید اسانس برای علف هیضه به میزان ۰/۲۸ درصد تعیین شد که به‌طور تقریبی با نتایج محمودی و همکاران (۹) همخوانی دارد. کروماتوگرام گازی اسانس علف هیضه در شکل ۱ آورده شده است. بر اساس آنالیز شیمیایی (جدول ۲)، اسانس علف هیضه حاوی ترکیبات



شکل ۱: کروماتوگرام گازی اسانس علف هیضه

مانند ترپین-۴-اول (۵/۱۰ درصد) و تیمول (۱/۹۰ درصد) نیز می‌توانند به اثر سینرژیک این اسانس در تعدیل میکروفلور شکمبه کمک کرده باشند. بر اساس نتایج (جدول ۳)، افزودن اسانس علف هیضه به محیط کشت باعث کاهش خطی و معنی‌دار ($P < 0.0001$) در

زیست‌فعال شناخته‌شده‌ای بود. به‌ویژه، حضور ترکیباتی نظیر ۱،۸-سینئول و آلفا-ترپینئول، که در مطالعات متعدد به‌عنوان ترکیباتی با خاصیت ضد میکروبی و ضد پروتوزوایی قوی گزارش شده‌اند (۲۳-۲۶)، می‌تواند سازوکار اصلی اثرات مشاهده‌شده بر فرآیند تخمیر شکمبه را توجیه کند. ترکیباتی

جدول ۳: تأثیر سطوح مختلف اسانس علف هیضه بر پارامترهای تولید گاز و متان

تولید گاز ۹۶ ساعته (میلی لیتر)	تولید گاز ۷۲ ساعته (میلی لیتر)	تولید گاز ۴۸ ساعته (میلی لیتر)	تولید گاز ۲۴ ساعته (میلی لیتر)	ثابت نرخ تولید گاز (درصد/ ساعت)	پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر)	متان ^۱ (میلی لیتر)	سطح اسانس (میلی گرم/لیتر)
۶۴/۰۰ ^a	۶۳/۵۳ ^a	۵۹/۷۲ ^a	۵۰/۲۳ ^a	۰/۰۹۵۲	۶۰/۹۸ ^a	۱۳/۲۵ ^a	۰ (شاهد)
۶۱/۱۵ ^{ab}	۶۰/۱۵ ^b	۵۶/۱۵ ^{ab}	۴۷/۱۵ ^{ab}	۰/۰۹۵۹	۵۸/۴۵ ^{ab}	۱۲/۱۳ ^{ab}	۲۵۰
۵۷/۹۷ ^b	۵۶/۵۰ ^c	۵۲/۵۰ ^b	۴۴/۳۵ ^b	۰/۰۹۵۳	۵۵/۰۱ ^b	۱۰/۸۳ ^{bc}	۵۰۰
۵۱/۷۵ ^c	۴۹/۸۵ ^d	۴۴/۵۰ ^c	۳۸/۱۵ ^c	۰/۰۸۹۶	۴۸/۲۸ ^c	۹/۳۲ ^{dc}	۷۵۰
۴۹/۴۵ ^c	۴۸/۴۳ ^d	۴۴/۰۷ ^c	۳۹/۱۰ ^c	۰/۰۸۷۴	۴۶/۶۰ ^c	۸/۰۳ ^d	۱۰۰۰
۱/۰۹	۱/۰۷	۱/۲۳	۱/۳۱	۰/۰۱۶۵	۱/۳۱	۰/۶۱	SEM
سطح معنی‌داری							
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۵۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	خطی
۰/۵۱	۰/۷۶	۰/۵۶	<۰/۰۰۰۱	۰/۸۱	۰/۶۵	<۰/۰۰۰۱	درجه دو
۰/۱۰	۰/۰۴	۰/۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۹۰	۰/۰۶	<۰/۰۰۰۱	درجه سه

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P < 0.05$).

^۱تولید گاز متان پس از ۲۴ ساعت دوره انکوباسیون اندازه‌گیری شد.

توسط بوداس و همکاران (۲۷) است؛ به‌طوری‌که از یک سو، کاهش جمعیت پروتوزوایی موجب تضعیف ارتباط همزیستی هیدروژنی آن‌ها با آرکئاهای متان‌زا و در نتیجه کاهش انتقال هیدروژن می‌شود و از سوی دیگر، ترکیباتی مانند

تولید متان (از ۱۳/۲۵ به ۸/۰۲ میلی لیتر) و پتانسیل تولید گاز کل (از ۶۰/۹۸ به ۴۶/۶۰ میلی لیتر) شد. این کاهش قابل توجه در متان‌زایی (از ۱۳/۲۵ به ۸/۰۲ میلی لیتر، معادل حدود ۳۹/۴۷ درصد)، احتمالاً ناشی از دو سازوکار اصلی گزارش‌شده

جدول ۴: تأثیر سطوح مختلف اسانس علف هیضه بر جمعیت پروتوزوآ و فراسنجه‌های تخمیری پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم/دسی لیتر محیط کشت)	pH	غلظت اسیدهای چرب فرار کل (میلی مول/لیتر محیط کشت)	پروتوزوآی کل ($10^5 \times$ سلول/میلی لیتر محیط کشت)	سطح اسانس (میلی گرم/لیتر محیط کشت)
۱۸/۰۱ ^a	۶/۸۶ ^a	۸۳/۰۱ ^a	۷/۲۷ ^a	۰ (شاهد)
۱۷/۲۵ ^{ab}	۶/۸۲ ^{ab}	۷۹/۰۲ ^{ab}	۶/۳۹ ^b	۲۵۰
۱۵/۹۵ ^{bc}	۶/۷۹ ^{bc}	۷۶/۲۵ ^{bc}	۵/۵۱ ^c	۵۰۰
۱۴/۹۵ ^{dc}	۶/۷۵ ^c	۷۲/۲۵ ^{cd}	۴/۴۵ ^d	۷۵۰
۱۳/۸۶ ^d	۶/۷۲ ^c	۷۰/۰۱ ^d	۴/۲۹ ^d	۱۰۰۰
۰/۵۵	۰/۰۲۳	۱/۴۵	۰/۲۷	SEM
سطح معنی داری				
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	خطی
۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۵۶	۰/۱۲	درجه دو
۰/۹۶	۰/۹۶	۰/۸۷	۰/۲۵	درجه سه

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P < 0.05$).

آرکئاهای متانوزن تأثیر گذاشته و سنتز متان را مهار کنند (۲۵ و ۲۶). بنابراین، کاهش مشاهده‌شده در این پژوهش را می‌توان حاصل ترکیبی از کاهش پروتوزوآهای انتقال‌دهنده هیدروژن و اثر بازدارنده مستقیم بر خود متانوزن‌ها دانست. همچنین، کاهش تولید گاز در تمام زمان‌های اندازه‌گیری

۸۰۱- سینئول و آلفا-ترپینئول با اثر مهارکنندگی مستقیم بر آرکئاهای متان‌زا یا با هدایت مسیر احیای هیدروژن به سمت تولید پروپیونات، در کاهش متان‌زایی نقش دارند. مطالعات نیز نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی این اسانس، به‌ویژه ۸۰۱-سینئول، می‌توانند به‌طور انتخابی بر متابولیسم

جدول ۵: تأثیر سطوح مختلف اسانس علف هیضه بر شاخص‌های تجزیه‌پذیری مواد مغذی و فراسنجه‌های کارایی میکروبی

تجزیه‌پذیری ماده خشک (درصد)	تجزیه‌پذیری ماده آلی (درصد)	تجزیه‌پذیری الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد)	ضریب تفکیک پذیری (میلی گرم ماده آلی حقیقی هضم شده/میلی لیتر گاز تولید شده)	راندمان سنتز توده میکروبی (درصد)	توده میکروبی تولیدی (میلی گرم)	سطح اسانس (میلی گرم/لیتر محیط کشت)
۷۰/۷۵ ^a	۷۵/۵ ^a	۴۶/۲۰ ^a	۲/۹۳ ^b	۲۴/۹۰ ^b	۴۶/۷۰ ^b	۰ (شاهد)
۶۸/۸۱ ^{ab}	۷۳/۸۷ ^{ab}	۴۳/۷۵ ^{ab}	۳/۰۵ ^{ab}	۲۷/۸۶ ^{ab}	۵۱/۹۶ ^{ab}	۲۵۰
۶۷/۰۱ ^{bc}	۷۰/۴۶ ^{bc}	۴۲/۷۵ ^{bc}	۳/۱۶ ^a	۳۰/۳۷ ^a	۵۵/۶۳ ^a	۵۰۰
۶۵/۰۱ ^c	۶۹/۷۳ ^c	۴۰/۷۱ ^{bc}	۳/۱۳ ^a	۲۹/۷۳ ^a	۴۸/۱۸ ^{ab}	۷۵۰
۶۳/۹۵ ^c	۶۸/۸۱ ^c	۳۹/۹۵ ^c	۳/۱۶ ^a	۳۰/۴۲ ^a	۴۷/۵۵ ^b	۱۰۰۰
۱/۲۰	۱/۲۳	۱/۰۷	۰/۰۵۸	۱/۳۷	۲/۴۳	SEM
سطح معنی داری						
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۷۱	خطی
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳	درجه دو
۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۱۴	درجه سه

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P < 0.05$).

نیز نشان‌دهنده کاهش کل تخمیرپذیری ماده آلی جیره در حضور اسانس است (۲۸).

نتایج (جدول ۴) نشان داد اسانس علف هیضه به‌طور خطی و معنی‌دار ($P < 0.001$) جمعیت پروتوزوآ را کاهش می‌دهد (از ۷/۲۷ به ۴/۲۹ $\times 10^5$ سلول در میلی‌لیتر، کاهش معادل ۴۰/۹۹ درصد). این اثر ضدپروتوزوآیی قوی می‌تواند مستقیماً ناشی از حساسیت بالای غشای سلولی پروتوزوآ به ترکیبات لیپوفیلیک اسانس، مانند تربین-۴-اول و آلفا-ترپینئول باشد (۲۹ و ۳۰). کاهش همزمان نیتروژن آمونیاکی (از ۱۸/۰۱ به ۱۳/۸۶ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) تأییدکننده کاهش تجزیه پروتئین و فعالیت پروتئولیتیکی است که بخشی از آن به دلیل کاهش جمعیت پروتوزوآ (مصرف‌کنندگان عمده باکتری و تولیدکنندگان آمونیاک) و بخشی به دلیل اثر مهار بر باکتری‌های پروتئولیتیک است (۳۱). کاهش غلظت اسیدهای چرب فرار کل و pH نیز همسو با کاهش تخمیرپذیری کلی سوبسترا می‌باشد.

اگرچه اسانس باعث کاهش خطی تجزیه‌پذیری ماده خشک، ماده آلی و NDF شد (جدول ۵)، اما راندمان سنتز توده میکروبی (از ۲۴/۹۰ به ۳۰/۴۲ درصد؛ افزایش ۲۲/۱۷ درصدی) و ضریب تفکیک‌پذیری (از ۲/۹۳ به ۳/۱۶ میلی‌گرم ماده آلی حقیقی هضم‌شده/میلی‌لیتر گاز تولیدشده؛ افزایش ۷/۸۵ درصدی) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این پارادوکس ظاهری با سازوکارهای زیر قابل توجیه است (۳۲): ۱) کاهش رقابت پروتوزوآ برای مصرف باکتری‌ها، انرژی بیشتری را برای سنتز بیومس میکروبی حفظ می‌کند. ۲) کاهش هدررفت انرژی به شکل گاز و متان، سوبسترای بیشتری را برای سنتز میکروبی در دسترس قرار می‌دهد. ۳) تغییر در ترکیب جامعه باکتریایی به نفع گونه‌های با کارایی رشد بالاتر. الگوی درجه دو معنی‌داری ($P = 0.03$) برای توده میکروبی تولیدی با اوج در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۵۵/۶۳ میلی‌گرم)، نشان‌دهنده اثر دوگانه اسانس است که در غلظت‌های پایین و متوسط محرک و در غلظت‌های بالا مهار عمل می‌کند. کاهش تجزیه‌پذیری NDF احتمالاً به دلیل حساسیت ویژه باکتری‌های سلولولیتیک به ترکیبات اسانس است (۳۳ و ۳۴). این یافته‌ها نشان می‌دهد که اسانس علف هیضه می‌تواند با وجود کاهش هضم‌پذیری، از طریق بهبود کارایی استفاده از انرژی، عملکرد کلی شکمبه

را تعدیل نماید.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه علف هیضه پتانسیل تعدیل تخمیر شکمبه‌ای را داراست. افزودن این اسانس به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش تولید متان (تا ۳۹/۵ درصد) و جمعیت پروتوزوآ (تا ۴۱ درصد) و همزمان بهبود راندمان سنتز توده میکروبی (تا ۲۲/۲ درصد) و ضریب تفکیک‌پذیری (تا ۷/۸ درصد) شد. با این حال، کاهش تجزیه‌پذیری ماده خشک، ماده آلی و به‌ویژه NDF نیز به‌عنوان یک اثر بازدارنده احتمالی بر هضم فیبر مشاهده گردید. غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان سطحی که بیشترین توده میکروبی را تولید کرد، می‌تواند نقطه شروع مناسبی برای مطالعات بعدی باشد. مهم‌ترین محدودیت این پژوهش، انجام آن در شرایط *in vitro* است که علی‌رغم کنترل دقیق متغیرها، لزوماً همه پیچیدگی‌های محیط زنده شکمبه را بازتولید نمی‌کند. بنابراین، توصیه می‌شود اثرات این اسانس ابتدا در مطالعات *in vivo* کوتاه‌مدت (با استفاده از حیوانات فیستوله‌دار) بر روی فراسنجه‌های تخمیری، قابلیت هضم واقعی و سلامت شکمبه ارزیابی گردد. در مرحله بعد، انجام آزمایش‌های بلندمدت تغذیه‌ای برای تعیین دقیق‌ترین سطح مؤثر در جیره‌های مختلف و سنجش نهایی پاسخ‌های عملکردی (افزایش وزن، بازده خوراک) و اقتصادی در گله ضروری است. بررسی اثرات سینرژیستیک این اسانس با سایر افزودنی‌های خوراکی نیز می‌تواند زمینه پژوهشی ارزشمندی باشد.

تشکر و قدردانی

سپاسگزاری خود را از مجتمع آموزش عالی تربت‌جام اعلام می‌داریم که با اعطای کمک‌های مالی و فراهم‌آوری امکانات آزمایشگاهی، بستر لازم برای اجرای این پژوهش را میسر ساخت.

تعارض منافع:

بر اساس اظهارات نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Nehme R, Andrés S, Pereira RB, Ben Jemaa M, Bouhallab S, Ceciliani F, et al. Essential oils in livestock: From health to food quality. *Antioxidants*. 2021;10(2):330. doi:10.3390/antiox10020330.
2. Kazemi M. Effects of hexane extract of medicinal plant *Artemisia aucheri* Boiss. on fermentation characteristics, gas production parameters, and degradability under *in vitro* conditions. *Iran J Med Aromat Plants*. 2019;35:902-913. (In Persian). doi:10.22092/ijmapr.2019.125475.2524.
3. Kazemi M, Eskandari Torbaghan Y. The effect of oil extracted from *Borago officinalis* L. whole plant at flowering stage on some ruminal fermentation parameters of sheep. *Vet Clin Pathol*. 2019;13:305-320. (In Persian). doi:10.30495/jvcp.2019.669193.
4. Kazemi M, Mokhtarpour A. The effect of *Nepeta glomerulosa* Boiss. essential oil on *in vitro* gas production and ruminal fermentation. *J Livest Sci Technol*. 2020;8:1-8. doi:10.22103/jlst.2020.16510.1328.
5. Nhara RB, Baloyi JJ. Complementary effects of essential oils and organic acids on rumen physiology as alternatives to antibiotic feed additives. *Animals*. 2025;15:2910. doi:10.3390/ani15192910.
6. Kazemi M, Ibrahimi KhorramAbadi E. The effect of hexane-extracted *Teucrium polium* L. on the ruminal microorganism's fermentation activity using *in vitro* technique. *Vet Res Biol Prod*. 2020;33(2):110-120. (In Persian). doi:10.22092/vj.2019.125546.1564.
7. Vargas JE, Andrés S, López-Ferreras L, Snelling TJ, Yáñez-Ruíz DR, García-Estrada C, et al. Dietary supplemental plant oils reduce methanogenesis from anaerobic microbial fermentation in the rumen. *Sci Rep*. 2020;10(1):1613. doi:10.1038/s41598-020-58401-z.
8. Malyugina S, Holik S, Horky P. Mitigation strategies for methane emissions in ruminant livestock: A comprehensive review of current approaches and future perspectives. *Front Anim Sci*. 2025;6:1610376. doi:10.3389/fanim.2025.1610376.
9. Mahmodi A, Gholami Pourfarad K, Mohtashami S. Investigation of the essential oil's phytochemical profile in *Pulicaria gnaphaloides* grown in rangeland ecosystems (Fars Province, Darab County, Iran). *Desert Ecosyst Eng*. 2025;13(45):89-105. doi:10.22052/deej.2025.256075.1089.
10. Batoli H, Haghir EA, Karimi I, Mazoochi A. The survey of the essential oil composition of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. from Brzok of Kashan at the first report. *Eco-Phytochem Med Plants*. 2017;5(1):65-77.
11. Mohammadhosseini M. Characterization of chemical profiles of essential oils and volatiles of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. using classical and advanced extraction methods. *Trends Phytochem Res*. 2024;8(3):203-219. doi:10.71596/tpr.2024.1187432.
12. NRC. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. 6th ed. Washington, DC: National Academy Press; 2007. 384 p.
13. Menke KH, Steingass H. Estimation of

- the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev*. 1988;28:7-55.
14. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol*. 1994;48(3-4):185-197. doi:10.1016/0377-8401(94)90171-6.
 15. Ørskov ER, McDonald I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J Agric Sci*. 1979;92:499-503. doi:10.1017/S0021859600063048.
 16. Van Soest PV, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*. 1991;74:3583-3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
 17. Barnett AJG, Reid RL. Studies on the production of volatile fatty acids from the grass by rumen liquor in an artificial rumen. *J Agric Sci*. 1957;48:315-321. doi:10.1017/S0021859600031671.
 18. Fievez V, Babaymo OJ, Demeyer D. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Anim Feed Sci Technol*. 2005;123:197-210. doi:10.1016/j.anifeeds-2005.05.001.
 19. Komolong MK, Barber DG, McNeill DM. Post-ruminal protein supply and N retention of weaner sheep fed on a basal diet of lucerne hay (*Medicago sativa*) with increasing levels of quebracho tannins. *Anim Feed Sci Technol*. 2001;92:59-72. doi:10.1016/S0377-8401(01)00246-2.
 20. Makkar HPS. *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: *In vitro Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants*. Springer, New York; 2010. p. 106-144. doi:10.1007/978-90-481-3297-3_7.
 21. Vercoe EP, Makkar HPS, Schlink AC. *In vitro* screening of plant resources for extra nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies. In: *In vitro Screening of Feed Resources for Efficiency of Microbial Protein Synthesis*. Springer, New York; 2010. p. 106-144. doi:10.1007/978-90-481-3297-3.
 22. Dehority BA. *Rumen Microbiology*. British Library Cataloguing in Publication Data; 2003. 372 p.
 23. Ben Akacha B, Michalak M, Generalić Mekinić I, Kačániová M, Chaari M, Brini F, et al. Mixture design of α -pinene, α -terpineol, and 1,8-cineole: A multiobjective response followed by chemometric approaches to optimize the antibacterial effect against various bacteria and antioxidant activity. *Food Sci Nutr*. 2024;12(1):574-589. doi:10.1002/fsn3.3780.
 24. Sevik Kilicaslan O, Cretton S, Hausmann E, Quirós-Guerrero L, Karimou S, Kaiser M, et al. Antiprotozoal activity of natural products from Nigerien plants used in folk medicine. *Front Pharmacol*. 2023;14:1190241. doi:10.3389/fphar.2023.1190241.

25. Patra AK, Saxena J. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009;96(4):363-375. doi:10.1007/s10482-009-9364-1.
26. Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci*. 2007;90(6):2580-2595. doi:10.3168/jds.2006-644.
27. Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim Feed Sci Technol*. 2012;176(1-4):78-93. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010.
28. Ferme D, Banjac M, Calsamiglia S, Busquet M, Kamel C, Avguštin G. The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. *Folia Microbiol*. 2004;49(2):151-155. doi:10.1007/BF02931391.
29. Monzote L, Alarcón O, Setzer WN. Antiprotozoal activity of essential oils. *Agric Conspec Sci*. 2012;77(4):167-175.
30. Newbold CJ, De La Fuente G, Belanche A, Ramos-Morales E, McEwan NR. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Front Microbiol*. 2015;6:1313. doi:10.3389/fmicb.2015.01313.
31. Wallace RJ, McEwan NR, McIntosh FM, Teferedegne B, Newbold CJ. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2002;15(10):1458-1468. doi:10.5713/ajas.2002.1458.
32. Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, et al. Special topics—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J Anim Sci*. 2013;91(11):5045-5069. doi:10.2527/jas.2013-6583.
33. Alabi JO, Okedoyin DO, Anotaenwere CC, Wuaku M, Gray D, Adelusi OO, et al. Essential oil blends with or without fumaric acid influenced *in vitro* rumen fermentation, greenhouse gas emission, and volatile fatty acids production of a total mixed ration. *Ruminants*. 2023;3(4):373-384. doi:10.3390/ruminants3040031.
34. Belanche A, Newbold CJ, Morgavi DP, Bach A, Zweifel B, Yáñez-Ruiz DR. A meta-analysis describing the effects of the essential oils blend Agolin Ruminant on performance, rumen fermentation and methane emissions in dairy cows. *Animals*. 2020;10(4):620. doi:10.3390/ani10040620.