مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۳ شماره ۴/ سال۱۴۰۲/ صفحات ۱ تا ۱۶
DOI: 10.22034/AS.2022.48689.1633

اثر دوزهای مختلف مخلوط اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری در جیره پرواری بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه

مرضیه رحمتی‌زاده[۱]، فردین هژبری[۲*] و فرخ کفیل زاده [۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/٤/۲۲
[۱]دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی
[۲]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی
[۳]استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی
*مسوول مکاتبه: hozhabri@razi.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی و هدف: این بررسی برای ارزیابی اثر دوزهای مختلف سه مخلوط اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری بر فراسنجه‌های تولید گاز در شرایط برون‌تنی انجام شد. **روش کار:** اسانس‌ها در سه سطح ۱۵۰، ۳۰۰، ٤٥٠ میکرولیتر با سه نسبت مختلف شامل A= (۲ : ۳ : ۱)، B= (۳ : ۱ : ۲) و C= (۱ : ۲ : ۳) مخلوط شدند و سپس اثر دوزهای مختلف (٦، ۱۲، ۱۸ میکرولیتر) از این سه ترکیب بر فراسنجه‌های تخمیر مورد مطالعه قرار گرفت. مایع شکمبه از سه رأس گوسفند قبل از تغذیه صبح از طریق فیستولای شکمبه به دست آمد. اثر مخلوط اسانس‌ها بر تولید گاز و کینتیک تولید گاز با انکوباسیون ۱۲۵ میلی‌گرم از هر نمونه در ساعات ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶بررسی شد. همچنین، در آزمایش دیگری با انکوباسیون نمونه‌ها طی ٢٤ ساعت، تولید گاز و تولید متان برآورد شد. **نتایج:** افزودن مخلوط اسانس‌ها در دوزهای مختلف سبب کاهش تولید گاز نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵) و بیشترین کاهش در مخلوط C مشاهده شد. از طرفی مخلوط اسانس‌ها بیشترین اثر کاهشی را در دوز ۱۸ میکرولیتر بر تولید گاز داشتند (P<۰/۰۵). پتانسیل تولید گاز (فراسنجه B) با افزودن مخلوط اسانس‌ها نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵) و بیشترین کاهش مربوط به مخلوط C بود (۱۹/۵۳ در مقابل ۱۱/۸۲) درحالی‌که نرخ تخمیر و فاز تأخیر افزایش یافت (P<۰/۰۵). تولید گاز بعد از ٢٤ ساعت و تولید متان با دوز بالای مخلوط B کاهش یافت (P>۰/۰۵). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج نشان داد که دوز ۱۸ میکرولیتر با کاهش کل تولید گاز و مخلوط B با دوز ۱۸ میکرولیتر با کاهش تولید متان پتانسیل تغییر تخمیر شکمبه را دارند.

واژه‌های کلیدی: پتانسیل تولید گاز، نرخ تولید گاز، متابولیت‌های ثانویه، متان، منتول

مقدمه

علی‌رغم رابطه همزیستی نشخوارکنندگان با میکروارگانیسم‌های شکمبه، این ارتباط، ناکارآمدی انرژی و پروتئین را به همراه دارد (ون ناول و دیمیر ۱۹۹۸). مواد خوراکی دریافتی در نشخوارکنندگان توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه تخمیر و هضم‌شده و اسیدهای چرب فرار، توده میکروبی و محصولات دیگری نظیر متان، دی‌اکسیدکربن و آمونیاک تولید می‌شود (هارت و همکاران ۲۰۰۹ و پن ۲۰۰۷). تولید متان، دی-اکسیدکربن و آمونیاک طی تخمیر در شکمبه باعث اتلاف انرژی و پروتئین، افزایش گازهای گلخانه‌ای و آلودگی محیط‌زیست می‌شود (بنچار و همکاران ۲۰۰۷). از طرفی

تولید متان در شکمبه نشخوارکنندگان سبب از دست رفتن ۱۵-۲ درصد از انرژی خام خوراک می‌شود (امینی‌پور و همکاران ۲۰۱۷). هدف متخصصین تغذیه افزایش بازده استفاده از انرژی و پروتئین از طریق کاهش دفع متان و نیتروژن آمونیاکی است (جهانی عزیزآبادی و همکاران ۲۰۱٤). استفاده از مواد افزودنی خوراکی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، یک ابزار مفید در کاهش اتلاف انرژی (متان) و نیتروژن (آمونیاک) است. اما استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در تغذیه دام پس از ژانویه ۲۰۰٦ در اتحادیه اروپا به دلیل خطر باقی‌مانده آن‌ها در شیر و گوشت و اثرات بعدی آن بر سلامت انسان ممنوع شده است (امینی‌پور و همکاران ۲۰۱۷). از اسانس گیاهان دارویی به دلیل اثر ضد میکروبی علیه باکتری‌ها، پروتوزوآ و قارچ‌ها، توانایی دست‌کاری تخمیر شکمبه و پتانسیل کاهش تولید متان در جیره غذایی نشخوارکنندگان استفاده می‌شود (گونال و همکاران ۲۰۱۷). نعناع فلفلی گیاهی علفی، چندساله و متعلق به خانواده نعناعیان است؛ متابولیت‌های ثانویه اصلی اسانس نعناع شامل منتول (۳۱/۵۳٪)، سینئول (۱۰/٦۷٪)، منتون (۸/۲٪)، منتیل استات (۳/٥٤٪)، بتا-کاریوفیلدن (۲٪/۸) و پیپریتون (۰/۷۷٪) می‌باشند (محمدی و همکاران ۲۰۱۷). نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد اسانس نعناع سبب کاهش متان، غلظت نیتروژن آمونیاکی، تعداد پروتوزوآ و تغییر نسبت مولار اسیدهای چرب کوتاه زنجیر می‌شود (احمد و همکاران ۲۰۱٤). آویشن نیز گیاهی چندساله از خانواده نعناعیان است (آونورک ۱۹۹۱) و اسانس آن حاوی بیش از ٦۰ ترکیب است که مهم‌ترین آن‌ها تیمول (٦۸٪/۱) و کارواکرول (۳/٥٪) می‌باشد که خواص آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها شناخته‌شده است (نیتو و همکاران ۲۰۱۰). برخی آزمایش‌ها نشان می‌دهند که اسانس آویشن سبب کاهش تولید گاز (رای و همکاران ۲۰۱٥)، متان (باراز و همکاران ۲۰۱۸)، بدون تأثیر بر غلظت نیتروژن آمونیاکی، کاهش نسبت استات به پروپیونات و افزایش پروپیونات (وکیلی و همکاران ۲۰۱۳) می‌شود. رزماری نیز گیاهی علفی، بوته‌ای، چندساله است، ماده متشکله اصلی برگ و سرشاخه‌های گیاه رزماری را اسانس تشکیل می‌دهد (فضل‌آرا و همکاران ۲۰۱۷). عمده متابولیت‌های ثانویه آن مونوترپن‌ها (۹۳/۰٦ درصد) هستند؛ اجزای اصلی شامل سینئول (٥۰/٤۲ درصد)، کامفور (۱۷/۷۳ درصد) و بورنئول (٥/۹۹ درصد) است (دئوری و همکاران ۲۰۱۳). فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی آن به حفاظت در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند. علاوه بر این، رزماری نشان داده شده است که اثرات ضد میکروبی دارد (شکرالهی و همکاران ۲۰۱٥). هرچند، که اسانس رزماری هیچ اثری بر روی کل تولید گاز و اسیدهای چرب فرار در شکمبه گوسفند نداشت (مجاهد و همکاران ۲۰۱۳). اگرچه در خصوص تأثیر اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری به‌تنهایی اطلاعات بسیار مفیدی در خصوص تأثیر مثبت آن‌ها بر تخمیر شکمبه وجود دارد، ولی مطالعه‌ای که در آن تأثیر مخلوط این اسانس‌ها را بررسی کرده باشد، در دسترس نیست. لذا در این مطالعه ابتدا اثر افزودن سطوح مختلف مخلوط‌هایی از این سه اسانس به یک جیره پرواری بر روند تولید گاز بررسی شد، سپس مخلوط‌های متفاوت ازنظر تأثیرشان بر کاهش میزان متان تولیدی مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش اسانس نعناع فلفلی، آویشن و رزماری در سه سطح ۱٥۰، ۳۰۰، ٤٥۰ میکرولیتر با سه نسبت مختلف شامل A= (۲ : ۳ : ۱)، B= (۳ : ۱ : ۲) و C= (۱ : ۲ : ۳) مخلوط شدند و سپس اثر دوزهای مختلف (٦، ۱۲، ۱۸ میکرولیتر) از این سه ترکیب بر فراسنجه‌های تخمیر موردمطالعه قرار گرفت. مایع شکمبه از سه رأس گوسفند ۱٤ ماهه نر سنجابی فیستولاشده جمع‌آوری شد. اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری از شرکت گلاب زاگرس، کرمانشاه خریداری شد. خوراک مورد آزمایش شامل ۳۰ درصد علوفه یونجه و ۷۰ درصد

کنسانتره (جو، کنجاله‌سویا، سبوس‌گندم، کربنات‌کلسیم، کمپلکس ویتامین و مواد معدنی و نمک) بود (جدول۱). ترکیب شیمیایی جیره با استفاده از روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (AOAC ۱۹۹۰). الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) و شوینده اسیدی (ADF) با استفاده از روش توصیه‌شده اندازه‌گیری شدند (ون‌سوست و همکاران ۱۹۹۱). نسبت‌های مختلف مخلوط اسانس‌های مورداستفاده در جدول ۲ نشان داده‌شده است.

آزمون تولید گاز

آزمون تولید گاز در طول ۹٦ ساعت با استفاده از روش مینک و استینگاس (۱۹۸۸) انجام شد. جیره مورداستفاده از الک یک میلی‌متری آسیاب شد (آسیاب Foss مدل Cyclotec™ 1093). مایع شکمبه قبل از خوراک وعده صبح از گوسفندان فیستولاشده جمع‌آوری و با استفاده از چهار لایه پارچه نخی، صاف شد و برای ایجاد شرایط بی‌هوازی به‌طور پیوسته با دی‌اکسیدکربن گازدهی و تا قبل از تلقیح در ۳۹ درجه سلسیوس نگهداری شد. مقدار۱۲۵میلی‌گرم از جیره مورد آزمایش به داخل هر بطری ویتن (سه بطری برای هر تیمار) ریخته شد. مایع شکمبه صاف‌شده با نسبت ۱ به ۲ با بافر مخلوط شد و مقدار ۱۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری‌شده به هر بطری اضافه شد. دوزهای مختلف ٦، ۱۲ و ۱۸ میکرولیتر از ترکیب‌های مختلف اسانس‌ها (A, B, C) به بطری‌ها اضافه شد. بطری‌های شاهد حاوی خوراک پایه و مایع شکمبه بافری‌شده و بطری‌های بلانک فقط حاوی مایع شکمبه بافری بدون خوراک پایه در نظر گرفته شد. سپس بطری‌ها در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۹ درجه سلسیوس قرار داده شدند. فشار گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ٤، ۸، ۱۲، ۲٤، ۳٦، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت پس از گرم‌خانه‌گذاری با دستگاه فشارسنج (Testo, Germany) ثبت شد. داده‌های گاز حاصل با در نظر گرفتن موقعیت جغرافیایی شهر کرمانشاه تبدیل به حجم شد (لوپز و همکاران، ۲۰۱۰).

۰/۲٤۱ + (٦/۵۹۱ × فشار گاز تولیدی) = حجم گاز تولیدی (میلی‌لیتر) [رابطه۱].

برآورد فراسنجه‌های گاز با استفاده از روش ارسکوف و مکدونالد (۱۹۷۹) انجام شد: [رابطه۲]

$Y= B (1-exp^{-c \times (t-L)})$ که در آن، Y= حجم گاز تولیدی در واحد زمان؛ B (ml) = پتانسیل گاز تولیدی (ml/gDM) ؛ C = نرخ تولید گاز (h) و L = فاز تأخیر.

آزمون تولید متان

آزمون تولید متان در زمان ۲٤ ساعت با استفاده از روش فویز و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. تهیه محلول‌ها و آماده‌سازی نمونه‌ها و بطری‌ها طبق روش آزمون تولید گاز انجام شد. با این تفاوت، در شرایط بی‌هوازی ۲۵ میلی‌لیتر از مایع شکمبه بافری‌شده (نسبت بافر به مایع شکمبه شامل دوسوم بافر و یک‌سوم مایع شکمبه) به هر بطری اضافه شد. با توجه به نتایج آزمون تولید گاز فقط دوز ۱۸ میکرولیتر هر یک از ترکیب اسانس‌ها به بطری‌های متناظر جهت بررسی تولید متان، اضافه شد. بعد از ۲٤ ساعت گاز تولیدشده، قرائت و سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر سود ۱۰ نرمال داخل هر بطری تزریق شد. پس از چند بار تکان دادن آهسته هر بطری، مجدداً مقدار گاز داخل هر بطری قرائت شد. بر اساس رابطه ۳ (فیوز و همکاران، ۲۰۰۵) تولید گاز متان در ۲٤ ساعت برآورد شد: [رابطه۳]

/(۱۵-گاز بعد از تزریق سود(میلی‌لیتر))]=درصد گاز متان ۱۰۰ × [گاز ساعت ۲٤ (میلی‌لیتر) قبل از تزریق سود

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از تولید و کینتیک گاز با روش فاکتوریل بعلاوه شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از برنامه (۲۰۰۳) SAS ویرایش ۹/٤ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد. مدل آماری مورداستفاده به‌صورت رابطه ٤ بود: [رابطه٤]

$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)ij + e_{ijK}$

که در این معادله، Y_{ij} مشاهده هر تیمار، μ میانگین کل، A_i اثرمخلوط اسانس‌های گیاهی، B_j اثر دوز اسانس، $(AB)ij$

اثر متقابل مخلوط اسانس‌ها و دوز اسانس‌ها و e_{ijk} اثر خطای آزمایش است.

تجزیه تحلیل داده‌های مربوط به تولید گاز ٢٤ ساعت و تولید متان در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از برنامه(۲۰۰۳) SAS ویرایش ۹/٤ رویه GLM انجام شد. مدل آماری مورداستفاده به‌صورت رابطه ٥ بود: [رابطه٥]

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ijK}$$

که در این معادله، Y_{ij} مشاهده هر تیمار، μ میانگین کل، T_i اثر مخلوط اسانس‌های گیاهی و e_{ijk} اثر خطای آزمایش است.

نتایج و بحث

اثر سطوح مختلف مخلوط اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری بر گاز تولیدی در زمان‌های مختلف.

مقایسه سه مخلوط اسانس‌های مورد آزمایش (جدول ۳) نشان داد که در زمان‌های ۲ تا ۱۲ ساعت انکوباسیون مخلوط‌های B (۲:۱:۳) و C (۳:۲:۱) روند کاهشی در تولید گاز نشان دادند، به‌نحوی‌که در مخلوط C کمترین مقدار در مقایسه با دو مخلوط دیگر بود (P<۰/۰۵). در زمان‌های ٢٤ تا ٤٨ ساعت انکوباسیون مخلوط‌های A و B اختلاف معنی‌داری نداشتند و مخلوط C کمترین مقدار در مقایسه دو مخلوط دیگر نشان داد (P<۰/۰۵). در زمان‌های ۷۲ تا ۹٦ ساعت انکوباسیون مخلوط‌های A، B و C اختلاف معنی‌داری ازنظر تولید گاز نشان ندادند (P>۰/۰۵). نتایج این آزمایش نشان داد که مخلوط C نسبت به دیگر مخلوط‌ها سبب کاهش بیشتر در تولید گاز شد. کاهش تولید گاز می‌تواند به کاهش فعالیت‌های تخمیری میکروارگانیسم‌ها و کاهش در قابلیت هضم ماده خشک مرتبط باشد (تان و همکاران ۲۰۱۱). از طرف دیگر، کاهش در تولید گاز به‌وسیله اسانس‌ها ممکن است استفاده کارآمدتر از انرژی به دلیل مهار اتلاف انرژی به‌صورت متان را نشان دهد (امینی پور و همکاران ۲۰۱۷). مطالعات متعددی به‌منظور بررسی اثرات اسانس گیاهان دارویی بر تولید گاز انجام‌شده و نتایج متفاوتی گزارش‌شده است. در مطالعه آگاروال و همکاران (۲۰۰۹) تولید گاز با سطوح ۰/۳۳ و ۱ میکرولیتر اسانس نعناع افزایش یافت، اما با سطح ۲ میکرولیتر مشابه با گروه کنترل بود. همچنین بوگا و کیلیچ (۲۰۱۷) گزارش کردند که افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نعناع منجر به افزایش تولید گاز در مقایسه با گروه شاهد شد. با توجه به‌اینکه مخلوط C محتوی نسبت بیشتری از اسانس نعناع بود و ترکیب اصلی اسانس نعناع را منتول (۳۱/۵۳٪) تشکیل می‌دهد که خواص ضد میکروبی آن شناخته‌شده است (محمدی و همکاران ۲۰۱۷)، می‌تواند با کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها دلیلی برای کاهش بیشتر تولید گاز در این مخلوط باشد. در مطالعه گونال و همکاران (۲۰۱۷) افزودن سطوح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس آویشن، کل تولید گاز در مقایسه با گروه شاهد ۱۰ تا ۱۱ درصد کاهش یافت. این محققین نتیجه گرفتند که کاهش ایجادشده به سبب اثرات اسانس آویشن بر تخمیر شکمبه و فعالیت میکروبی است.

در آزمایش حاضر، سطوح مختلف مخلوط‌های اسانس، تولید گاز را کاهش دادند، به‌طوری‌که در زمان‌های ۲ تا ۹٦ ساعت انکوباسیون سطوح ٦ و ۱۲ ازنظر تولید گاز اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵)؛ درصورتی‌که سطح ۱۸ میکرولیتر نسبت به سطوح ٦ و ۱۲ ازنظر تولید گاز کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). در سطح ۱۸ میکرولیتر بیشترین کاهش مشاهده شد؛ مخلوط A محتوی نسبت بیشتری اسانس آویشن بود. تیمول و کارواکرول دو ترکیب اصلی فنولی فعال در اسانس آویشن محسوب می‌شوند که حداکثر ٦۰ درصد از کل ترکیبات شناسایی‌شده را تشکیل می‌دهند (گونال و همکاران ۲۰۱۷)؛ تیمول و کارواکرول فعالیت ضد میکروبی قوی علیه باکتری‌ها نشان داده‌اند و این فعالیت مهاری به دلیل حضور گروه فنولی در این ترکیبات اسانس است (دیویدسون و نیدو ۲۰۰۰). در مطالعه رای و همکاران (۲۰۱٤) افزودن سطوح ۳۰، ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری، تأثیری بر تولید گاز در

مقایسه با گروه شاهد نداشت. همچنین سطوح ٤٠٠ و ٨٠٠ میکرولیتر در کیلوگرم مخلوط اسانس‌های اکالیپتوس، دارچین، نعناع، آویشن و لیمو (احمد و همکاران ٢٠١٤) و سطوح ٥٠، ٢٠٠ و ٥٠٠ میلی‌گرم در لیتر از مخلوط اسانس‌های آویشن، پونه کوهی، دارچین و لیمو (لین و همکاران ٢٠١٢) تأثیری بر تولید گاز نداشت. ولی نتایج حاصل از آزمایش حاضر، مخلوط B که نسبت بیشتر آن اسانس رزماری بود، بیشترین کاهش را در تولید گاز نسبت به گروه شاهد نشان داد. در مطالعه حاضر، کاهش بیشتر در تولید گاز با سطح ١٨ میکرولیتر ممکن است به دلیل اثر کاهشی سینئول بر تخمیر میکروبی شکمبه باشد. به نظر می‌رسد که اثر این ماده در مقایسه با مواد مؤثره نعناع فلفلی و آویشن در کاهش تولید گاز قابل‌توجه باشد. از طرفی با توجه به حضور هم‌زمان آویشن و نعناع فلفلی در مخلوط C می‌توان گفت که اثر تجمعی مواد مؤثره اسانس‌های مذکور سبب بیشترین کاهش در تولید گاز در مقایسه با دو مخلوط دیگر است. نشان داده‌شده است که با افزودن سطح ٢ میلی‌لیتر اسانس آویشن و نعناع تولید گاز کاهش یافت (امینی پور و همکاران ٢٠١٧). استفاده از مخلوط اسانس‌ها در سطح ٦ میکرولیتر نشان داد که مخلوط A که محتوی بیشترین مقدار اسانس آویشن و رزماری بود تأثیری بر تولید گاز در طول انکوباسیون نسبت به شاهد نداشت درحالی‌که مخلوط C، که محتوی مقادیر بیشتر اسانس‌های نعناع و آویشن بود، در دوز پائین و بالا بیشترین تأثیر را بر تولید گاز داشت. در مطالعه بوگا و کیلیچ (٢٠١٧) اثر سطوح ٥٠، ١٠٠ و ١٥٠ میلی‌گرم در لیتر از اسانس‌های نعناع، رزماری و رازیانه در مواد خوراکی جو، کاه گندم و کنجاله سویا بررسی شد. اثر دوز اسانس نعناع و رزماری در زمان‌های ٢٤ و ٤٨ ساعت انکوباسیون معنی‌دار نبود ولی برای زمان ٩٦ ساعت بر تولید گاز در کاه گندم، معنی‌دار بود. افزودن سطح ١٥٠ میلی‌گرم در لیتر از اسانس های رازیانه منجر به تولید گاز کمتر در مقایسه با گروه شاهد در جو شد. علاوه بر این، سطح ١٥٠ میلی‌گرم در لیتر اسانس نعناع منجر به تولید گاز بالاتر (٧٥/٦٩ میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه شاهد (٦٨/٥١ میلی‌لیتر) برای زمان ٩٦ ساعت انکوباسیون شد. درصورتی‌که در نتایج مطالعه حاضر کاهش تولید گاز در سطح ١٨ میکرولیتر نسبت به سطوح ٦ و ١٢ میکرولیتر مخلوط‌های استفاده شده در تمام زمان‌های انکوباسیون معنی‌دار بود و مقدار گاز کمتری تولید شد. اختلاف بین نتایج به‌دست‌آمده در مطالعات مختلف ممکن است به عواملی مانند دوزهای اسانس مورد استفاده، جیره غذایی پایه، فرم مورداستفاده (جهانی عزیزآبادی و همکاران ٢٠١٤) و نسبت‌های مختلف اسانس‌ها در مخلوط‌های اسانسی به‌کاررفته، بستگی داشته باشد.

عبدالتواب و همکاران (٢٠٢١) گزارش کردند که افزودن سطوح ٢/٥، ٥ و ١٠ گرم در هر کیلوگرم ماده خشک جیره غذایی از مخلوط گیاهان دارویی آویشن و کرفس منجر به کاهش کل تولید گاز در مقایسه با جیره شاهد شد. همچنین گزارش شده است که افزودن ٥، ١٠، ١٥، ٢٠ و ٢٥ گرم در هر کیلوگرم ماده خشک از برگ‌های مرزنجوش یا ریحان (عبدالتواب و همکاران،٢٠٢٢)، یا سطوح مختلف (٥، ١٠، ١٥، ٢٠ و ٢٥ میلی‌لیتر در هرکیلوگرم ماده خشک) اسانس ریحان یا مرزنجوش (سلیم و همکاران، ٢٠٢١) منجر به کاهش در تولید گاز شد. مطالعات برون‌تنی نشان می‌دهند که مکمل‌کردن جیره با اسانس‌های گیاهی باعث تغییر در روند تخمیر شکمبه شده و بر تولید گاز موثر می‌باشند (عبدالتواب و همکاران، ٢٠٢٢). علاوه بر این، گزارش شده است درجه بازدارندگی به ترکیب شیمیایی اسانس مورد استفاده بستگی دارد (سلیم و همکاران، ٢٠٢١).

اثر سطوح مختلف مخلوط اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری بر کینتیک تولید گاز

کینتیک تولید گاز مربوط به سه مخلوط مورد آزمایش در جدول ٤ نشان داده‌شده است. پتانسیل تولید گاز (B) در بین سه مخلوط اختلاف معنی‌داری نداشت (P>٠/٠٥)،

هرچند ازلحاظ عددی در مخلوط C کمترین مقدار را داشت. نرخ تولید گاز (c) نیز روند مشابهی داشت به‌نحوی‌که علی‌رغم عدم اختلاف معنی‌داری بین سه مخلوط (P>۰/۰۵)، ازلحاظ عددی مخلوط C کمترین مقدار نرخ تولید گاز را نشان داد. با توجه به اینکه نسبت بیشتر مخلوط C را اسانس نعناع تشکیل می‌دهد و خواص ضد میکروبی قوی آن شناخته‌شده است؛ کاهش پتانسیل تولید گاز (B) و نرخ تولید گاز (c) در مخلوط C می‌تواند به دلیل نسبت بیشتر اسانس نعناع در این مخلوط باشد. فاز تأخیر (L) روند افزایشی در بین مخلوط‌ها نشان داد، به‌طوری‌که مخلوط C بیشترین مقدار را ازلحاظ این فراسنجه نشان داد. گزارش‌های محدودی در خصوص اثرات اسانس‌ها بر کینتیک تولید گاز ارائه‌شده است. در یک مطالعه علاوه بر سطوح اسانس‌های مختلف، نوع سوبسترا نیز روی کینتیک تولید گاز اثر داشته است به‌نحوی‌که در حضور دانه جو در مقایسه با کنجاله سویا یا کاه گندم ، پتانسیل تولید گاز در جو و افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نعناع و در کاه گندم با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. بااین‌حال، نرخ تولید گاز در سوبسترای جو با افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نعناع پایین‌تر و ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری بالاتر از گروه شاهد بود (بوگا و کیلیچ ۲۰۱۷). در مطالعه میرزایی و همکاران (۲۰۱۶) سطوح ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس آویشن در دو جیره غذایی (۱۰۰٪ علوفه و ۳۰٪ علوفه :۷۰٪ کنسانتره) نشان داد تولید گاز با سطوح ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در جیره محتوی ۱۰۰٪ علوفه کاهش یافت، درصورتی‌که در جیره محتوی علوفه و کنسانتره فقط دوز ۱۰۰۰ میکروگرم تولید گاز را کاهش داد؛ نرخ تخمیر (c) در هر دو جیره کاهش یافت و بیشترین اثر در دوز ۱۰۰۰ میکروگرم مشاهده شد. با توجه به اینکه نسبت دوسوم مخلوط C را اسانس آویشن تشکیل می‌دهد و تیمول و کارواکرول از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه اسانس آویشن محسوب می‌شوند که در ساختار شیمیایی خود یک گروه فنولیک دارند ممکن است اثرات مشابهی از تانن‌ها در دوزهای بالا روی هضم بخش‌های محلول سوبسترا و کاهش اتصال میکروب‌ها به بخش‌های نامحلول سوبسترا داشته باشند (میرزایی و همکاران ۲۰۱۶). در غلظت‌های پایین، تانن‌ها بویژه تانن‌های متراکم اثرات مثبتی به جهت محافظت کردن پروتئین جیره از تجزیه شکمبه‌ای و به دنبال آن افزایش قابلیت دسترسی در سطح روده برای هضم و جذب دارند (الکساندر و همکاران، ۲۰۰۷). تانن‌های خالص از منابع مختلف بر نرخ و مقدار تولید گاز و هضم‌پذیری حقیقی در شرایط برون‌تنی موثر است. تانن‌ها اتصال میکروب‌ها به ذرات غذایی را کم می‌کنند. تانن متراکم اثرات بیشتری بر تولید و گوارش‌پذیری حقیقی نسبت به اسید تانیک دارد، که این احتمالاً به ارتباط بین ساختار تانن متراکم و نوع فعالیت آن مربوط باشد. تانن‌ها در سطوح پایین، توانایی تعدیل تخمیر شکمبه‌ای به سمت حداکثر سنتز پروتئین میکروبی را دارند. کاهش در نرخ هضم در خوراک‌های حاوی تانن می‌تواند به همزمانی آزادسازی مواد مغذی مختلف در شکمبه منجر شود که موجب افزایش بازدهی میکروبی می‌شود (ماکار، ۲۰۰۳). میرزایی چشمه گچی و همکاران (۲۰۱۷) نیز نشان دادند که از سطوح ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس آویشن شیرازی تنها سطح ۱۰۰۰ میکروگرم پتانسیل تولید گاز و نرخ تولید گاز را کاهش داد. به نظر می‌رسد که تأثیرگذاری این اسانس‌ها تابع دوز مصرفی در محیط کشت باشد و مخلوط کردن اسانس‌ها تأثیر متفاوتی با توجه به نسبت استفاده از هرکدام از اسانس‌ها در مخلوط داشته باشد. در این حالت نیز با توجه به نتایج این آزمایش سطح ۱۸ میکرولیتر مخلوط اسانس‌ها بیشترین تأثیر را روی کینتیک تخمیر داشته است. افزایش فاز تأخیر (L) در مخلوط C و همچنین دوز ۱۸ میکرولیتر ممکن است به سبب اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی بالای ژرانیول باشد. ژرانیول یکی دیگر از متابولیت‌های ثانویه اسانس

آویشن است (میرزایی و همکاران ۲۰۱۶). افزایش فاز تأخیر با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم آویشن در برخی مطالعات نیز گزارش‌شده است (میرزایی چشمه گچی و همکاران ۲۰۱۷ و میرزایی و همکاران ۲۰۱۶). هرچند گزارش شده است با افزودن ۴۰ گرم پودر سیر به جیره غذایی در شرایط درون تنی کل تولید گاز در زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت؛ بخش b نسبت به تیمار شاهد کاهش و بخش a افزایش یافت. ثابت نرخ تولید گاز (c) تحت تاثیر قرارنگرفت (کوان و همکاران، ۲۰۲۱).

مقایسه سه مخلوط اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری بر تولید متان

با توجه به اینکه در آزمایش تولید گاز در زمان‌های ۲ تا ۹۶ ساعت هر سه سطح ۶، ۱۲ و ۱۸ میکرولیتر تولید گاز را در تمام زمان‌های انکوباسیون به‌طور معنی‌داری کاهش دادند و در سطح ۱۸ میکرولیتر بیشترین کاهش در تولید گاز مشاهده شد، بنابراین در آزمایش تولید متان در زمان ۲۴ ساعت فقط از سطح ۱۸ میکرولیتر انتخابی حاصل از آزمایش اول به‌منظور مقایسه سه مخلوط اسانس استفاده شد (جدول ۵). در سطح ۱۸ میکرولیتر اسانس مخلوط سه گیاه، روند کاهشی در تولید متان مشاهده شد، به‌نحوی‌که در مخلوط B کمترین مقدار در مقایسه با گروه شاهد بود ($P<0/05$). به‌عبارتی‌دیگر مخلوط B به‌طور مؤثرتری در کاهش تولید متان عمل کرده است. گزارش‌شده است که اثر اسانس‌ها بر تولید متان ممکن است ناشی از سمیت به متانوژن‌ها، کاهش تولید هیدروژن به دلیل کاهش تولید استات و بوتیرات (به‌عنوان‌مثال، کاهش تجزیه فیبر) یا کاهش هضم مواد آلی باشد (گونال و همکاران ۲۰۱۷). اسانس‌های روغنی ممکن است با مهار مستقیم رشد و فعالیت میکروب‌های متانوژنیک یا به‌طور غیرمستقیم با کاهش تعداد تک‌یاخته‌های مرتبط با متانوژن‌ها (گونال و همکاران ۲۰۱۷) یا کاهش غیرمستقیم برخی فرآیندهای متابولیسم میکروبی متانوژن (کوبلیس و همکاران ۲۰۱۵) بر تولید متان تأثیر بگذارند. در مطالعه آگاروال و همکاران (۲۰۰۹) با افزودن سطوح ۰/۳۳، ۱ و ۲ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس نعناع، کاهش خطی در تولید متان به‌اندازه ۱۹/۹، ۴۶ و ۷۵/۶ درصد در شرایط آزمایشگاهی گزارش‌شده است. همچنین در مطالعه رای و همکاران (۲۰۱۵) سطوح ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نعناع در مقایسه با گروه کنترل سبب کاهش تولید متان به ترتیب به‌اندازه ۱۶/۶ و ۱۸/۱ درصد شد. با توجه به این‌که نسبت دوسوم مخلوط B را اسانس نعناع تشکیل می‌دهد، درصد تولید متان در مخلوط B نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. گزارش‌شده است که کاهش تولید متان ممکن است به دلیل کاهش پروتوزوآی کل توسط منتول به‌عنوان اجزای اصلی فعال اسانس نعناع باشد (رای و همکاران ۲۰۱۵). استفاده از دوز مطلوب اسانس نعناع باعث کاهش معنی‌دار در تولید متان بدون اثر بر قابلیت هضم خوراک و عملکرد حیوان می‌شود (آگاروال و همکاران ۲۰۰۹). در مطالعه گونال و همکاران (۲۰۱۷) از سطوح ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس آویشن استفاده شد و فقط سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش ۷۸ درصدی در تولید متان شد. همچنین در مطالعه چوداری و همکاران (۲۰۱۶) اسانس آویشن در سطح ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش ۶۸/۸ درصد در تولید متان شد. این محققین تیمول را به‌عنوان متابولیت ثانویه اصلی اسانس مشتق شده از گیاه آویشن معرفی کرده و آن را یک مهارکننده قوی تولید متان در شرایط آزمایشگاهی معرفی کردند. با توجه به این‌که، مخلوط A محتوی نسبت بیشتری اسانس آویشن است، درصد تولید متان در مخلوط A نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشت. تیمول و کارواکرول به‌عنوان دو ترکیب اصلی فعال فنولی در اسانس آویشن می‌باشند که حداکثر ۶۰ درصد از کل ترکیبات شناسایی‌شده را تشکیل می‌دهند. تیمول و کارواکرول فعالیت ضد میکروبی قوی علیه باکتری‌ها نشان داده‌اند. این فعالیت مهاری به دلیل وجود گروه فنولی در این ترکیبات اسانس است. اسانس آویشن

یا اجزای آن ممکن است آرکیاهای متانوژنیک را مهار کند یا استفاده از هیدروژن توسط این میکروارگانیسم‌ها را کاهش دهد، درنتیجه منجر به تجمع هیدروژن مولکولی در محیط شکمبه می‌شوند. کاهش تولید متان در شکمبه معمولاً با افزایش تولید پروپیونات نیز همراه است، زیرا وقتی هیدروژن کمتری به سمت تولید متان هدایت می‌شود، تشکیل پروپیونات به‌عنوان سینک هیدروژن در شکمبه عمل می‌کند (گونال و همکاران ۲۰۱۷). متانوژن‌ها از دی اکسید کربن و هیدروژن به عنوان سوبسترا برای تولید گاز متان استفاده می‌کنند. پروتوزوآ هم نقش برجسته‌ای در تولید هیدروژن دارد (میرزایی و همکاران، ۲۰۱٦). افزودن اسانس به محیط تخمیر شاید توانسته است از راه کاهش جمعیت پروتوزوآیی یا آرکیاها و باکتری‌ها، میزان متان تولیدی را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش دهد (میرزایی و همکاران، ۲۰۱٦). جو و همکاران (۲۰۲۲) با افزودن اسانس گیاهان دارویی علف چای، خرزه هندی، عناب، انگور و سماق ژاپنی به محیط کشت در شرایط آزمایشگاهی گزارش کردند تولید متان در تمام تیمارها در زمان ۱۲ ساعت انکوباسیون نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌داری نداشت، درحالی‌که در تیمارهای خرزه هندی، عناب، انگور و سماق ژاپنی در زمان ۲٤ ساعت انکوباسیون نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. گزارش شده است که فلاونوئیدها دارای اثرات ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت شکمبه هستند (کوشنی و لم، ۲۰۰۵). کیم و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که افزودن عصاره گیاهی غنی از فلاونوئیدها، فرآوانی *فیبروباکتر سوکسینوژنز* را افزایش داد، اما فرآوانی *رومینوکوکوس آلبوس* و *رومینوکوکوس فلاوفاسینس* را کاهش داد. این نشان می‌دهد که احتمالاً عصاره گیاهان دارویی تأثیر منفی بر هضم سلولز نداشته است، زیرا گونه‌های فیبروباکتر سلولز کریستالی را فعال‌تر از گونه‌های رومینوکوکوس هضم می‌کنند (جو و همکاران، ۲۰۲۲). همچنین گزارش شده است که *رومینوکوکوس آلبوس* و *رومینوکوکوس فلاوفاسینس* باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن هستند، درحالی‌که *فیبروباکتر سوکسینوژنز* هیدروژن تولید نمی‌کند (جو و همکاران، ۲۰۲۲). بنابراین، عصاره گیاهان دارویی می‌توانند تولید متان را کاهش دهند، زیرا تغییرات در جمعیت میکروبی ممکن است باعث کاهش تولید پیش‌سازهای متان مانند هیدروژن شده باشد. آرکیاهای تولیدکننده متان به‌عنوان متانوژن‌ها، گروه متمایزی از موجودات هستند که جزء طبیعی اکوسیستم میکروبی شکمبه هستند (تاوندال و همکاران، ۲۰۰۵). کوورا و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که برخی از عصاره‌های گیاهی حاوی متابولیت‌های ثانویه مانند تانن‌ها، ساپونین‌ها و فلاونوئیدها هستند که به‌عنوان سرکوبگر مستقیم آرکیاهای متانوژنیک در شکمبه عمل می‌کنند. این مطالعه نشان می‌دهد که فرآوانی آرکیاهای متانوژنیک در تمام تیمارهای عصاره گیاهان دارویی پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر بود. تفاوت اثرات اسانس‌ها بر تولید متان را می‌توان با اثرات بازدارنده اسیدهای فنولیک و پلی‌فنل‌ها موجود در آن‌ها بر روی جمعیت متانوژن‌ها، فعالیت آن‌ها یا هر دو توضیح داد (بوداس و همکاران، ۲۰۱۲). علاوه‌براین، محل کاشت گیاهان دارویی بر ترکیبات پلی‌فنولی در گیاهان تأثیر می‌گذارد و درنتیجه انواع فلاونوئیدها و محتویات اسید فنولیک ایجاد می‌شود، که متعاقباً تخمیر شکمبه و متانوژنز را به‌طور متفاوتی اعمال می‌کنند (پوچالسکا و همکاران، ۲۰۲۱). آگاروال و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که سطح ۱ و ۲ میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت از اسانس نعناع فلفلی سبب کاهش تعداد نسبی کل باکتری‌ها، باکتری‌های تولیدکننده متان، قارچ‌ها و *فیبروباکتر سوکسینوژنوس* شد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که نعناع فلفلی به‌طور مستقیم با کاهش تعداد باکتری‌های تولیدکننده متان، تولید متان را کاهش می‌دهد. در مطالعه رای و همکاران (۲۰۱٤) استفاده از سطوح ۳۰، ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس رزماری، میزان دوز ۳۰ میلی‌گرم در لیتر تولید متان را به‌طور معنی‌داری کاهش

داد، اما هیچ کاهش بیشتری در دوزهای بالاتر مشاهده نشد. با توجه به این‌که مخلوط B محتوی نسبت بیشتری اسانس رزماری است، درصد تولید متان در مخلوط B نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. کاهش بیشتر تولید متان در مخلوط B را می‌توان به اسانس رزماری نسبت داد. در مطالعه کوبلیس و همکاران (۲۰۱۶) استفاده از ۱/۱۲۵ میلی لیتر در لیتر از هرکدام از اسانس‌های پونه کوهی، رزماری، دارچین، برگ دارچین، پوست دارچین، دانه شوید و اوکالیپتوس به طور جداگانه سبب کاهش ۷۸/۵ درصدی در تولید متان شد درحالی‌که مخلوط این اسانس‌ها به میزان ۰/۸ میلی‌لیتر در لیتر سبب کاهش ۳۷/۷ درصدی در تولید متان شد. کاهش مهار در تولید متان در مخلوط‌های A و C نسبت به شاهد را می‌توان به عواملی مانند دوز پایین‌تر اسانس مورداستفاده در مخلوط اسانس، تضاد بالقوه بین ترکیبات اسانس از اسانس‌های مختلف، اثر هم‌افزایی به دلیل دوز بسیار کمتری که در مخلوط اسانس استفاده می‌شود، بستگی داشته باشد. در حقیقت، برخی از ترکیبات اسانس حتی اگر در غلظت کم وجود داشته باشد، ممکن است با ترکیبات اصلی برهم‌کنش داشته و بر فعالیت بیولوژیکی آن‌ها تأثیر بگذارد (کوبلیس و همکاران ۲۰۱۵). ولی در مطالعه احمد و همکاران (۲۰۱٤) سطوح ٤۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر در کیلوگرم مخلوط اسانس‌های اکالیپتوس، دارچین، نعناع، آویشن و لیمو تغییری در تولید متان ایجاد نکرد. به‌طور مشابهی در نتایج ما، مخلوط A با نسبت بیشتر آویشن و مخلوط C با نسبت بیشتر نعناع بر تولید متان اثر معنی‌داری نداشتند. عواملی نظیر دوز نامناسب، ترکیب شیمیایی، نسبت علوفه به کنسانتره و زمان سازگاری نیز ممکن است در عدم تأثیر مخلوط اسانس‌ها بر خصوصیات تخمیر شکمبه نقش داشته باشد (احمد و همکاران ۲۰۱٤). به‌نحوی‌که استفاده از سطوح ۱، ۱/۵ و ۲ گرم در لیتر اسانس‌های پونه کوهی سبب کاهش متان از ۵۵ تا ۷۲ درصد شد درحالی‌که اسانس رزماری تولید متان را فقط در دوز ۲ گرم در لیتر و به‌اندازه ۸/۵ درصد کاهش داد (کوبلیس و همکاران ۲۰۱۵). در مطالعه لین و همکاران (۲۰۱۳) مخلوط‌های اسانس بر پایه فنول (اسانس آویشن و پونه کوهی) نسبت به مخلوط‌های اسانس بر پایه آلدئید (اسانس دارچین و لیمو) تولید متان را به میزان بیشتری کاهش دادند. اختلاف بین نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر و نتایج برخی مطالعات را می‌توان به عواملی نظیر تفاوت در جیره‌های غذایی دام دهنده مایع شکمبه، تفاوت در سوبسترا و گازهای تجمع یافته در فضای بالای بطری آزمایش مورداستفاده طی انکوباسیون آزمایشگاهی و همچنین زمان جمع‌آوری مایعات شکمبه نسبت به مصرف وعده غذایی دام نسبت داد که ممکن است بر نتیجه تولید متان تأثیر داشته باشد (پاترا و یو ۲۰۱۲). الزیات و همکاران (۲۰۲۱) با افزودن سطوح ۲۰ و ٤۰ میلی‌لیتر در روز اسانس گیاه چریش به جیره گزارش کردند که دوز بالای اسانس منجر به کاهش تولید متان به‌اندازه ۱۳ درصد در مقایسه با گروه شاهد شد. بااین‌حال، در مطالعات برون‌تنی و درون‌تنی بسته به عواملی مانند ترکیبات طبیعی اسانس، دوز مورد استفاده، نسبت‌ها، مدت زمان تجویز و ویژگی‌ها و مدیریت حیوانات نتایج بسیار متغیر است. این عوامل می‌توانند بر میکروفلور شکمبه و فعالیت آن‌ها و درنتیجه اثربخشی تیمار تأثیر بگذارند (اسگویفو روسی و همکاران، ۲۰۲۲).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد که در آزمایش تولید گاز در زمان‌های ۲ تا ۹٦ ساعت هر سه سطح ٦، ۱۲ و ۱۸ میکرولیتر تولید گاز را در تمام زمان‌های انکوباسیون کاهش دادند به‌طوری‌که در سطح ۱۸ میکرولیتر بیشترین کاهش در تولید گاز مشاهده شد. از بین سه مخلوط مورداستفاده مخلوط B بیشترین اثر در کاهش تولید متان را نشان داد. بنابراین دوز ۱۸ میکرولیتر با کاهش کل تولید گاز و مخلوط B با دوز ۱۸ میکرولیتر با کاهش تولید متان پتانسیل تغییر تخمیر شکمبه را دارند.

Table 1- Ingredient and chemical composition of diet (%)

Ingredients	DM (%)
Alfalfa	30
Barley	33
Soybean meal	7
Wheat bran	28.5
Calcium carbonate	0.7
Vitamin and mineral mixture	0.5
Salt	0.3
Chemical Composition	
Dry Matter	94
Organic matter	87.15
Ash	6.85
Crude protein	16.99
Ether extract	2.95
ADF[1]	21.47
NDF[2]	40.78

[1]Acid detergent fiber, [2]Neutral detergent fiber

Table 2- Different ratios of mixed essential oils tested (µL)

Essential oil	Mixture A	Mixture B	Mixture C
Peppermint	150	300	450
Thyme	450	150	300
Rosemary	300	450	150
Ratio of mixtures	1 :3 :2	2 :1 :3	3 :2 :1

Table 3- Effect of different doses (6, 12,18 µL) of three mixtures of peppermint, thyme and rosemary essential oils on gas production (mL/g DM) during 96 h of incubation

Time (h)	Control[1]	Mixture [2]			Dose (ul)			SEM[3]	P-value		
		A	B	C	6	12	18		Mixture	Dose	Mixture*Dose
2	28.49^{a}	22.56^{b}	16.08^{c}	6.70^{d}	17.63^{b}	15.65^{b}	11.99^{c}	0.74	0.001	0.001	0.127
4	53.63^{a}	43.93^{b}	33.41^{c}	19.67^{d}	36.65^{b}	32.86^{b}	27.50^{c}	1.14	0.001	0.001	0.032
8	64.97^{a}	62.01^{a}	50.30^{b}	38.17^{c}	55.18^{b}	52.59^{b}	42.71^{c}	1.85	0.001	0.003	0.006
12	86.16^{a}	78.72^{a}	69.77^{b}	60.98^{c}	76.03^{b}	73.98^{b}	59.45^{c}	2.28	0.001	0.001	0.004
24	111.43^{a}	101/28^{ab}	92.89^{cb}	86.92^{c}	101.58^{ab}	97.90^{b}	81.61^{c}	3.10	0.013	0.004	0.004
36	133.84^{a}	118.31^{b}	107.18^{bc}	103.67^{c}	119.55^{b}	113.32^{b}	96.30^{c}	3.85	0.036	0.001	0.007
48	153.47^{a}	128.51^{b}	115.98^{b}	113.97^{b}	131.88^{b}	122.02^{b}	104.56^{c}	4.58	0.075	0.002	0.002
72	168.06^{a}	132.95^{b}	121.36^{b}	119.21^{b}	139.89^{b}	126.18^{b}	107.44^{c}	5.15	0.154	0.001	0.002
96	176.33^{a}	134.88^{b}	124.06^{b}	121.58^{b}	144.26^{b}	128.05^{bc}	108.21^{c}	5.52	0.219	0.007	0.003

[1] Control = Without additive

[2] Mixture = Peppermint: Thyme: Rosemary, A (1:3:2) = 6, 12, 18 µl, B= (2:1:3)= 6, 12, 18 µl, C= (3:2:1) = 6, 12, 18 µl.

[3]SEM: Standard error of mean

[a-d] Means within the same row with different superscript differ significantly (P<0.05).

Table 4- Effect of different levels (6, 12,18 µL) of three mixtures of essential oils of peppermint, thyme and rosemary on kinetic parameters of gas production

Parameter	Control[1]	Mixture [2]			Dose (µl)			SEM[3]	P-value		
		A	B	C	6	12	18		Mixture	Dose	Mixture*Dose
B (ml/gDM)	180.05^{a}	134.40^{b}	123.48^{b}	121.67^{b}	143.26^{b}	127.52^{bc}	108.75^{c}	5.40	0.22	0.01	0.01
c (ml/h)	0.056^{c}	0.079^{a}	0.068^{b}	0.050^{d}	0.060^{c}	0.070^{a}	0.066^{b}	0.01	<0.01	<0.01	<0.01
L (h)	-41.46^{d}	-16.66^{c}	-6.54^{b}	8.65^{a}	-9.34^{b}	-3.11^{ab}	-2.10^{a}	1.79	<0.01	0.02	0.86

[1]Control = without additive

[2] Mixture = Peppermint: Thyme: Rosemary, A (1:3:2) = 6, 12, 18 µl, B= (2:1:3)= 6, 12, 18 µl, C= (3:2:1) = 6, 12, 18 µl.

[3]SEM: Standard error of mean

[a-d] Means within the same row with different superscript differ significantly (P<0.05).

Table 5- Effect of 18 microliter level of mixtures of peppermint, thyme and rosemary essential oils on gas and methane production in 24 hours

Parameter	Control	Mixture A	Mixture B	Mixture C	SEM	P-value
Gas_{24} ml/g DM	219.22[a]	204[b]	198.80[b]	200.08[b]	2.38	0.001
Methane (%)	36.24[a]	34.38[b]	32.69[c]	34.16[bc]	0.53	0.002

[1]Treatment: Control = without additive, Mixture A= Peppermint: Thyme: Rosemary (1:3:2) = 18 µl, Mixture B= Peppermint: Thyme: Rosemary (2:1:3) =18 µl, Mixture C=Peppermint: Thyme: Rosemary (3:2:1) =18 µl.
[2]GP: amount of gas produced after 24 h incubation
[3]SEM: Standard error of mean
[a-d] Means within the same row with different superscript differ significantly (P<0.05).

منابع مورداستفاده

Agarwal N, Shekhar C, Kumar R, Chaudhary LC and Kamra DN, 2009. Effect of peppermint (*menthapiperita*) oil *on in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. Animal Feed Science and Technology 148: 321-327.

Abd El Tawab AM, Abdellatif Khattab MS, Hadhoud FI and Shaaban M, 2021. Effect of mixture of herbal plants on ruminal fermentation, degradability and gas production. Journal of Animal Sciences 43, e48549.

Abd EL Tawab AM, Kholif AM, El-Bordeny NE, Elsayed HM and Selim NAH, 2022. Ruminal fermentation, degradability and gas production response to supplementing diets with Marjoram or Basil leaves *In-vitro*. Egyptian Journal of Chemistry 65: 263-269.

Ahmed MG, El-Zarkouny SZ, El-Shazly KA and Sallam SMA, 2014. Impact of essential oils blend on methane emission, rumen fermentation characteristics and nutrient digestibility in Barki sheep. Journal of Agricultural Science 6: 144-156.

Alexander G, Singh B, Sahoo A and Bhat TK, 2007. 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: 229-242.

Amini Pour H, Naserian AA, Vakili AR and Tahmasbi AM, 2017. Effect of essential plant oil used as an additive to alter silage fermentation in ruminant by *in vitro*. Biosciences Biotechnology Research Asia 14: 145-152.

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

Baraz H, Jahani-Azizabadi H and Azizi, O, 2018. Simultaneous use of thyme essential oil and disodium fumarate can improve in vitro ruminal microbial fermentation characteristics. Veterinary Research Forum 9: 193-198.

Benchaar C, Petit HV, Berthiaume R, Quellent DR, Chiquette J and Chouinard PY, 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial population, milk production and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. Journal of Dairy Science 90: 886-897.

Bodas R, Prieto N, Garca-Gonzalez R, Andres S, Giraldez FJ and Lopez S, 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. Animal Feed Science and Technology 176: 78–93.

Boga M and Kilic U, 2017. The effects of some essential oils on *in Vitro* gas production of different feedstuffs. International Journal of Advances in Agriculture Sciences 2: 1-8.

Chaudhary PP, Goel1 N, Baker G, Saxena J, Singh N, Chaturvedi I, Sharma A and Sirohi SK, 2016. Influence of essential oils supplementation on rumen fermentation profile and ruminal microbial population *in vitro*. Journal of Science 4: 25-34.

Cobellis G, Petrozzi A, Forte C, Acuti G, Orru M, Marcotullio MC, Aquino A, Nicolini A, Mazza V and Marinucci MT, 2015. Evaluation of the effects of mitigation on methane and ammonia production by using *Origanum vulgare l.* and *Rosmarinus officinalis l.* essential oils on *in vitro* rumen fermentation systems. Journal of Sustainability 7: 12856-12869.

Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Marcotullio MC and Yu Z, 2016. Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria *in vitro*. Animal Feed Science and Technology 215: 25–36.

Cushnie TPT and Lamb AJ, 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents 26: 343–356.

Davidson PM and Naidu AS, 2000. Phyto-phenols. Pp: 265–293. In: Naidu AS, (ed). Natural food antimicrobial systems. Boca Raton, USA: CRC Press.

Douiri LF, Bougdad A, Assobhei O and Moumni M, 2013. Chemical composition and biological activity of essential of *Alulium sativum* against *Callosobruchus maculates*. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology 3: 30-36.

El-Zaiat HM, Alqaisi O, Sallam SM and Al-Marzooqi WS, 2021. Effect of increasing doses of neem (*Azadirachtaindica*) seed oil on feed intake, nutrients digestibility, ruminal fermentation and nitrogen utilization of Omani sheep. Animal Biotechnology 3:1-9.

Fazlara A, Pourmahdi M, Zarei M and Karimi T, 2017. Effect of edible chitosan-rosemary coating on quality and shelf life of refrigerated chicken fillets. Iranian Veterinary Journal 13(54): 78-90.

Fievez V, Babayem OJ and Demeyer D, 2005. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. Animal Feed Science and Technology 123: 197–210.

Gunal M, Pinski B and Abu Ghazaleh AA, 2017. Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under *in vitro* conditions. Italian Journal of Animal Science p: 1-7.

Hart KJ, Martin PG, Foley PA, Kenny DA and Boland TM, 2009. Effect of sward dry matter digestibility on methane production, ruminal fermentation, and microbial populations of zero-grazed beef cattle. Journal of Animal Science 87:3342–3350.

Honork L, 1991. Effect of environmental factors on the production of some essential oil plants. Hort. Abstract No. 3075.

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

Kewan KZ, Ali MM, Ahmad BM, El-Kolty SA and Nayel UA, 2021. The effect of yeast *(saccharomyces cerevisae*), garlic (*Allium sativum*) and their combination as feed additives in finishing diets on the performance, ruminal fermentation, and immune status of lambs. Egyptian Journal of Nutrition and Feeds 24: 55-76.

Kim ET, Guan LL, Lee SJ, Lee SM, Lee SS, Lee ID, Lee S and Lee SS, 2015. Effects of flavonoid-rich plant extracts on in vitro ruminal methanogenesis, microbial populations and fermentation characteristics. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 28(4):530–537.

Ku-Vera JC, Jim_enez-Ocampo R, Valencia-Salazar SS, Montoya-Flores MD, Molina-Botero IC, Arango J, Gomez- Bravo CA, Aguilar-Perez CF and Solorio anchez FJ, 2020. Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. Frontiers in Veterinary Science 7:584.

Lin B, Lu Y, Wang JH, Liang Q and Liu JX, 2012. The effects of combined essential oils along with fumarate on rumen fermentation and methane production *in vitro*. Journal of Animal and Feed Sciences 21: 198–210.

Lin B, Lu Y, Salem AZM, Wang JH, Liang Q and Liu JX, 2013. Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. Animal Feed Science and Technology 184: 24– 32.

Lopez S, Makkar HPS and Soliva CR, 2010. Screening plants and plant products for methane inhibitors. Pp: 191-231. In: Vercoe PE, Makkar HPS and Schlink AC (eds). *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies. Springer, Dordrecht, the Netherlands.

Makkar HPS, 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research 49: 241-256.

Menke KH, and Steingass H, 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Animal Research and Development 28: 7–55.

Mirzaei Cheshmehgachi S, Moeini MM, Hozhabri F and Nooryan Soroor ME, 2017. Effect of essential oils *of Zataria multiflora*, *Eucalyptus globolus* and their combination on fermentation parameters using Merghoz goat rumen liquor. Iranian Journal of Applied Animal Science 7: 53-59.

Mirzaei Z, Hozhabri F and Alipour D, 2016. *Thymus kotschyanus* essential oil components and their effects on *in vitro* rumen fermentation, protozoal population and acidosis parameters. Iranian Journal of Applied Animal Science 6: 77-85.

Mohamadi R, Rahchamani R, Ghanbari F and Farivar F, 2017. Peppermint and pennyroyal essential oil effect on performance, rumen microbial population and some blood parameters of sheep. Iranian Journal of Veterinary Medicine 11: 75-84.

Moujahed N, Bouaziz Y and Khelfa A, 2013. Effects of essential oils from *Rosmarinus officinalis* and *Thymus capitatus* on *in vitro* rumen fermentation in sheep. Pp: 35-38. In: Ben Salem H and López-Francos A (eds). Feeding and management strategies to improve livestock productivity, welfare and product quality under climate change. Zaragoza, FAO.

Nieto G, Diaz P, Banon S and Garrido MD, 2010. Effect on lamb meat quality of including thyme (*Thymus zygis ssp. gracilis*) leaves in ewes' diet. Journal of Meat Science 85: 82–88.

Ørskov ER and McDonald I, 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal of Agriculture Science 92: 499–503.

Patra AK and Yu Z, 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. Applied and Environmental Microbiology 78: 4271–4280.

Pen B, 2007. Studies on manipulation of ruminal fermentation and methanogenesis by natural products. Ph.D. Dissertation, Major Chair of Animal Production the United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University.

Puchalska J, Szumacher-Strabel M, Patra AK, Slusarczyk S, Gao M, Petric D, Nabzdyk M and Cieslak A, 2021. The effect of different concentrations of total polyphenols from Paulownia hybrid leaves on ruminal fermentation, methane production and microorganisms. Journal of Animals 11: 28-43.

Roy D, Tomar SK and Kumar V, 2015. Rumen modulatory effect of thyme, clove and peppermint oils *in vitro* using buffalo rumen liquor. Veterinary World 8: 203-207.

Roy D, Tomar SK, Sirohi SK, Kumar V and Kumar M, 2014. Efficacy of different essential oils in modulating rumen fermentation *in vitro* using buffalo rumen liquor. Veterinary World 7: 213-218.

SAS Institute, 2003. SAS User's Guide. Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Selim NAH, Abd El Tawab AM, Kholif AM, Elsayed HM, El-Bordeny NE and Farahat ESA, 2021. Impact of the essential oils of Marjoram or Basil dietary supplementation on degradability, ruminal fermentation and total gas production in vitro. Egyptian Journal of Nutrition and Feeds 24:85-93.

Sgoifo Rossi CA, Grossi S, Dell'Anno M, Compiani R and Rossi L, 2022. Effect of a blend of essential oils, bioflavonoids and tannins on in vitro methane production and in vivo production efficiency in dairy cows. Journal of Animals, 12, 728.

Shokrollahi B, Amini F, Fakour Sh and Amiri Andi M, 2015. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on weight, hematology and cell-mediated immune response of newborn goat kids. Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics 116: 91-97.

Tan HY, Sieo CC, Abdullah N, Liang JB, Huang XD and Ho YW, 2011. Effects of condensed tannins from *leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. Journal of Animal Science 169: 185-193.

Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT and Sivakumaran S, 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with Lotus pedunculatus and Medicago sativa, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Animal Feed Science and Technology 124:403–419.

Jo, S UK, Lee S Ja, Kim HS, Eom JS, Choi Y, Oh Da S, Bae D and Lee SS, 2022. Effects of oriental medicinal plants on the reduction of methane production mediated by microbial population. Italian Journal of Animal Science 21: 522–531.

Vakili AR, Khorrami B, Danesh Mesgaran M and Parand E, 2013. The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein calves consuming high concentrate diet. Asian Australasian Journal of Animal Sciences 26: 935-944.

Van Nevel CJ and Demeyer DI, 1988. Manipulation of rumen fermentation. In: The Rumen Microbial Ecosystem P.N. Hobson (ed). Elsevier Applied Science, New York, NY.

Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science 74: 3583-3597.

Effect of different doses of several mixtures of three essential oils of peppermint, thyme and rosemary on fermentation parameters of fattening diet by in vitro method

M Rahmatizadeh[1], F Hozhabri[2*] and F Kafilzadeh[3]

Received: October 30, 2021 Accepted: June 13, 2022
[1]PhD Scholar, Department of Animal Science, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
[2*]Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
[3] Professor, Department of Animal Science, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
*Corresponding author: Email: hozhabri@razi.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research
Journal of Animal Science/vol.33 No.4/ 2024/pp 1-16
https://animalscience.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 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.2022.48689.1633

Introduction: The use of food additives such as antibiotics is a useful tool in reducing energy loss (methane) and nitrogen (ammonia). However, the use of antibiotics in animal feed has been banned in the EU since January 2006 due to their residual risk in milk and meat and its subsequent effects on human health (Aminipour et al. 2017). Essential oils of herbals are used because of their antimicrobial effect against bacteria, protozoa and fungi, their ability to manipulate rumen fermentation, and their potential to reduce methane production in ruminant diets (Gunal et al. 2017). The results of research show that peppermint essential oil reduces methane, ammonia nitrogen concentration, number of protozoa and changes the molar ratio of short-chain fatty acids (Ahmad et al. 2014). Some experiments show that thyme essential oil reduces the production of gas (Roy et al. 2015), methane (Baraz et al. 2018). Although there is useful information about the effects of peppermint, thyme and rosemary essential oils on their positive effect on rumen fermentation, a study examining the effect of a mixture of these essential oils is not available. Therefore, this study was conducted to evaluate the effect of different doses of three mixes of peppermint, thyme and rosemary essential oils (6, 12 and 18 µl) on *in vitro* gas production parameters**.**

Material and methods: The essential oils were mixed in three levels of 150, 300, 450 µl, with three different ratio including A=(1: 3: 2), B=(2: 1: 3) and C=(3: 2: 1); thereafter, the effect of different doses (6, 12, 18 µl) of these three combinations on fermentation parameters was studied. Rumen fluid was obtained from three sheep before morning feeding via rumen fistula. The effect of the mixture of essential oils on gas production and kinetics of gas production was investigated by incubating 125 mg of each sample at 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours. Also, in another experiment, by incubating the samples for 24 hours, gas production and methane production were estimated. Also**,** different mixtures were compared in terms of their effect on reducing the amount of methane production.

Results and discussion: Adding a mixture of essential oils in different doses reduced gas production compared to the control group ($P<0.05$). Comparison of the three mixtures of essential oils tested showed that during the incubation period of 2 to 12 hours, mixtures B and C showed a decreasing trend in gas production, meanwhile mixture C had the lowest value compared to the other two

mixtures (P<0.05). There was no significant difference between mixtures A and B during 24 to 48 hours of incubation, but mixture C showed the lowest value compared to the other two mixtures (P<0.05). At 72 to 96 hours of incubation, mixtures A, B and C did not show significant differences in gas production (P<0.05). The results of this experiment showed that mixture C caused a further reduction in gas production than other mixtures. Decreased gas production can be related to a decrease in the fermentation activities of microorganisms and a decrease in dry matter digestibility (Tan et al. 2011). On the other hand, reduction in gas production by essential oils may indicate more efficient use of energy due to inhibition of energy loss in the form of methane (Aminipour et al. 2017). In the present experiment, different doses of essential oil mixtures reduced gas production, so that at 2 to 96 hours of incubation, doses of 6 and 12 did not differ significantly in terms of gas production (P <0.05); but the level of 18 µl compared to other doses showed a significant decrease in gas production (P <0.05). The mixture of essential oils at the level of 6 µl showed that mixture A, which contained the highest amount of thyme and rosemary essential oils, had no effect on gas production during incubation compared to control, while mixture C, which contained higher amounts of peppermint and Thyme essential oils had the greatest impact on gas production. The gas production potential (B) was not significantly different between the three mixtures (P>0.05), although numerically it was the lowest in mixture C (19.53 versus 11.82). Gas production rate (c) had a similar trend so that despite the lack of significant differences between the three mixtures (P>0.05), numerically C mixture showed the lowest value in terms of this parameter. A decreasing trend in methane production at the level of 18 µl of essential oil of a mixture of three herbals was observed, so that in mixture B was the lowest value compared to the control group (P <0.05). Essential oils may directly inhibit the growth and activity of methanogenic microbes, or indirectly by reducing the number of methanogen-related protozoa (Gonal et al. 2017) or by indirect reduction in some processes of methanogenic microbial metabolism (Cobellis et al. 2015) affect methane production. Due to the fact that the proportion of two thirds of mixture B is peppermint essential oil, the percentage of methane production in mixture B compared to the control showed a significant decrease. It has been reported that the decrease in methane production may be due to the reduction of total protozoan by menthol as the main active ingredient of peppermint essential oil (Roy et al. 2015).

Conclusion: The results of this study showed that in the gas production test at 2 to 96 hours, all three levels of 6, 12 and 18 microliters significantly reduced gas production at all incubation times, even 24 hours, so at the level of 18 microliters, the largest decrease in gas production was observed. Of the three mixtures used, mixture B showed the greatest effect in reducing methane production. Therefore, a dose of 18 µl with a decrease in total gas production and mixture B with a dose of 18 µl with a decrease in methane production has the potential to change ruminal fermentation.

Keywords: Gas production potential, Gas production rate, Secondary metabolites, Methane, Menthol