نشریه علوم دامی ایران
دوره ۴۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳ (ص۱۷۱-۱۶۳)

تأثیرافزودن تفالهٔ اسانس‌گیری‌شده مرزهٔ خوزستانی به جیرهٔ بره‌های پرواری بر پویایی تولید گاز به روش آزمایشگاهی

سیده سهیلا نوشادی[۱]، آرش آذرفر[۲*]، داریوش علیپور[۳] و حشمت‌الله خسروی‌نیا[۲]
۱. ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، گروه علوم دامی دانشگاه لرستان، ۳. استادیار، گروه علوم دامی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان
(تاریخ دریافت:۹۲/۹/۱۷ - تاریخ تصویب: ۹۳/۵/۳)

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر جایگزینی تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزهٔ خوزستانی به‌جای یونجه در سطوح صفر (تیمار شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۷۵، و ۱۰۰ در جیرهٔ برهٔ پرواری بر پویایی تولید گاز به روش آزمایشگاهی بود. جیره‌های آزمایشی براساس ۲۰ درصد علوفه و ۸۰ درصد کنسانتره تنظیم گردید. جایگزینی تفالهٔ مرزه به‌جای یونجه تأثیر معنی‌داری بر تولید گاز در ساعات گوناگون انکوباسیون و فراسنجه‌های پویایی آن نداشت (P>۰/۰۵). غلظت آمونیاک به‌طور معنی‌داری با جایگزینی تفالهٔ مرزهٔ به‌جای یونجه در مقایسه با جیرهٔ شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵). جیره‌های آزمایشی تأثیری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرّار نداشت (P>۰/۰۵). اگرچه جایگزینی تفالهٔ مرزه در سطوح ۷۵ و ۱۰۰ درصد قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک را در مقایسه با جیرهٔ شاهد کاهش داد (P<۰/۰۵)، ولی تأثیر معنی‌داری بر قابلیت هضم واقعی مادهٔ خشک در شرایط آزمایشگاهی نداشت (P>۰/۰۵). جایگزینی تا سطح ۷۵ درصد، تولید و بازده تولید تودهٔ میکروبی را به‌طور عددی افزایش داد (P<۰/۱). نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزه در جیرهٔ برهٔ پرواری می‌تواند با کاهش میزان تولید نیتروژن آمونیاکی بازدهی استفاده از نیتروژن را بهبود بخشد.

کلیدواژگان: برهٔ پرواری، ، پویایی تولید گاز، تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزهٔ خوزستانی.

مقدمه

میکروارگانیسم‌های موجود در شکمبهٔ نشخوارکنندگان طی فرایند تخمیر مواد غذایی، اسیدهای چرب فرّار و پروتئین میکروبی تولید می‌کنند. اگرچه تخمیر شکمبه‌ای مواد مغذی، انرژی، و پروتئین لازم نشخوارکنندگان را فراهم می‌کند، اما این فرایند همراه با هدرروی انرژی به‌صورت متان و پروتئین به‌صورت نیتروژن آمونیاکی است (Schelling, 1984). این فرایند همچنین سبب آزادسازی آلوده‌کننده‌های محیط زیست مانند متان نیز می‌گردد. به همین دلیل امروزه استفاده از افزودنی‌های خوراکی با قابلیت مهار رشد گونه‌های خاصی از میکروارگانیسم‌های شکمبه و سایر بخش‌های دستگاه گوارش که به کاهش تولید متان و آمونیاک می‌انجامد، در جیرهٔ نشخوار کنندگان ضروری به نظر می‌رسد. آنتی‌بیوتیک‌های یونوفری همانند مونسین و لاسالوسید از این افزودنی‌ها هستند (McGuffey *et al*., 2001). گرچه استفاده از این ترکیبات باعث کاهش تولید گاز متان و آمونیاک می‌شود ولی ظهور بقایای آن‌ها در تولیدات دامی و خطراتی که برای مصرف‌کنندگان دارند، مانند افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در عوامل بیماری‌زای انسانی، دلیل ممنوعیت استفاده از آن‌ها در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته است (European Commission, 2003). برای حل این مشکل متخصصان تغذیهٔ دام استفاده از مواد طبیعی را به‌منظور افزایش بازده تخمیر شکمبه‌ای برای کنترل و یا پیشگیری از تولید متان و آمونیاک پیشنهاد کردند (Calsamiglia *et al*., 2007). استفاده از اسانس‌های گیاهی همچون زیرهٔ سبز، نعناع فلفلی، و دانهٔ زیره می‌تواند علاوه بر داشتن تأثیرات ضد

تلفن: ۰۹۱۶۶۶۲۷۸۴۵ E-mail: arash.azarfar@gmail.com

باکتریایی، سبب ایجاد طعم، رایحه، تغییرخصوصیات فیزیکی، و بازارپسندی محصولات دامی گردند (Calsamiglia *et al*., 2007). تأثیرات گوناگون اسانس‌ها بر تخمیر میکروبی شکمبه در مطالعات متعددی گزارش شده است (Busqet *et al*., 2006; Crdozo *et al*., 2005). از این تأثیرات می‌توان کاهش آمین‌زدایی اسیدهای آمینه (McIntosh *et al*., 2003)، افزایش اسیدهای چرب فرّار شکمبه (Castilejos *et al*., 2005)، و کاهش تولید متان در شکمبه (Kamra *et al*., 2005) را نام برد. یکی از گیاهان مهم حاوی اسانس مرزۀ خوزستانی گیاهی با نام علمی *Satureja khuzistanica* با اسانس‌دهی سه تا پنج درصد وزن گیاه است. از خصوصیات بارز اسانس مرزۀ خوزستانی وجود مقدار بالایی از کارواکرول (۹۴ درصد) و سایر ترکیبات فنولی، تری‌ترپنوئیدها، استروئیدها، فلاون‌ها، و تانن‌هاست (Khosravinia *et al*., 2103). پس از اسانس‌گیری با بخار آب تفالۀ باقیمانده به‌عنوان پسماند فرایند تقطیر باقی می‌ماند که بعد از خشک‌کردن در آفتاب می‌تواند به‌عنوان بخشی از جیره در تغذیۀ دام‌های نشخوارکننده استفاده شود. مشخص شده است که با استفاده از روش تقطیر توسط بخار آب، اسانس موجود در گیاه به‌طور کامل از آن استخراج نمی‌شود و تفالۀ باقیمانده حاوی حدود ۰/۶ درصد اسانس (براساس مادۀ خشک) است (Khosravinia *et al*., 2103). هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیرات استفاده از سطوح گوناگون تفالۀ اسانس‌گیری‌شدۀ مرزۀ خوزستانی با توجه به وجود مقداری اسانس در آن، بر پویایی تولید گاز در شرایط برون‌تنی بود.

مواد وروش‌ها

تفالۀ اسانس‌گیری‌شدۀ گیاه مرزۀ خوزستانی از لابراتوار تحقیقات گیاهان دارویی خرمان در خرم‌آباد تهیه گردید. تجزیۀ تقریبی تفالۀ اسانس‌گیری‌شدۀ گیاه مرزه در آزمایشگاه خوراک دام معاونت امور دام جهاد کشاورزی استان لرستان انجام شد (جدول۱). پس از آسیاب‌کردن نمونه‌ها و عبور از الک یک‌میلی‌متری، میزان مادۀ خشک (DM, AOAC 930.15)، پروتئین خام (CP, AOAC 984.13)، چربی خام (EE, AOAC 954.02)، خاکستر خام (Ash, AOAC 942.05) و کلسیم (AOAC, 927.02) تعیین شد (AOAC, 1990). میزان الیاف نامحلول در شویندۀ اسیدی (ADF)، الیاف نامحلول در شویندۀ خنثی (با استفاده از آلفاـآمیلاز و سولفات سدیم، NDF)، و لیگنین (ADL) با استفاده از روش Van Soest *et al*. (1991) اندازه‌گیری شد. پروتئین نامحلول در شویندۀ اسیدی (ADICP) و پروتئین‌خام نامحلول در شویندۀ خنثی (NDICP) براساس روش ارائه‌شده توسط Licitra *et al*. (1996) تعیین شد (Ankom A200 Filter Bag Technique; Ankom Technology, Fairport, NY, USA). جیره‌ها با نسبت ۲۰ درصد علوفه به ۸۰ درصد کنسانتره و مطابق با جدول احتیاجات غذایی گوسفند NRC (1984) تنظیم شد. تفالۀ اسانس‌گیری‌شدۀ گیاه مرزه به مقدار صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۷۵، و ۱۰۰ درصد جایگزین یونجه در جیره گردید. به‌منظور اندازه‌گیری تولید گاز در شرایط برون‌تنی، نمونۀ جیره‌های آزمایشی با الک یک‌میلی‌متری آسیاب شد. تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی مطابق با روش ارائه‌شدۀ Menke & Steingass (1988) انجام شد. برای اندازه‌گیری تخمیر از سرنگ‌های شیشه‌ای مدرج (Fortuna, Häberle Labrortechnik, Lonsee-Ettlenschie, Germany) با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر استفاده گردید. مقدار۲۰۰ میلی‌گرم از هر کدام از تیمارها توزین و به داخل سرنگ‌ها منتقل شد. برای هر تیمار چهار سرنگ در نظر گرفته شد. مایع شکمبه از سه رأس گوسفند بالغ نر نژاد مهربان (۴/۵±۵۰ کیلوگرم وزن زنده) فیستولاگذاری‌شده، قبل از تغذیۀ صبحگاهی گرفته شد. مطابق با نیازهای مواد مغذی حیوانات با ۷۰۰ گرم به‌ازای کیلوگرم مادۀ خشک از علوفۀ یونجه و۳۰۰ گرم به‌ازای کیلوگرم مادۀ خشک از کنسانتره به اضافۀ مکمل ویتامین‌ها و مواد معدنی تغذیه شدند (NRC, 1985). از هر گوسفند میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه از تمام قسمت‌های شکمبه و پیش از تغذیۀ صبحگاهی جمع‌آوری شد. مایع شکمبۀ جمع‌آوری‌شده از حیوانات به نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط شد و پس از عبوردادن از چهار لایه پارچۀ پنیر به درون فلاسک از پیش گرم‌شده حاوی دی‌اکسید کربن (۳۹ درجۀ سانتی‌گراد) ریخته شد و بلافاصله به

آزمایشگاه انتقال یافت. مایع شکمبهٔ جمع‌آوری‌شده تحت دمش مداوم دی‌اکسید کربن عاری از اکسیژن به نسبت ۱ به ۲ با بافر فسفات-بیکربنات مخلوط شد و تا زمان انتقال به سرنگ‌ها در حمام آب گرم (۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد) نگهداری شد. مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و بافر فسفات-بیکربنات به داخل سرنگ‌های محتوی نمونهٔ خوراک ریخته شد. سپس سرنگ‌ها در حمام آب گرم با دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. میزان تولید گاز در زمان‌های ۱، ۲، ۵، ۸، ۱۴، ۱۷، ۲۰، ۲۴، ۲۷، ۳۰، ۳۳، ۳۷، ۴۱، ۴۶، ۵۱، ۵۶، ۶۲، ۷۰، ۷۹، ۹۶، ۱۲۰، و ۱۴۴ساعت پس از کشت ثبت شد. اندازه‌گیری تولید گاز در سه دوره (به‌عنوان تکرار آزمایشگاهی) صورت پذیرفت. در هر دوره، دو سرنگ به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد و حجم گاز تولیدی در آن‌ها برای تصحیح داده‌ها استفاده شد. پروفیل گاز تولیدی با استفاده از معادلهٔ ارائه‌شدهٔ Ørskov & McDonald (1979) برازش شد:

$$G=a\left[1-e^{-ct}\right] \qquad \text{(رابطهٔ ۱)}$$

در این معادله G میلی‌لیتر گاز تولیدشده به‌ازای هر گرم مادهٔ آلی انکوباسیون‌شده (ml/g OM)، a مجانب تولید گاز (ml)، c سرعت تولید گاز در زمان t (ساعت) بود. نیمهٔ عمر تولید گاز ($t_{1/2}$) با استفاده از رابطهٔ ۲ محاسبه گردید:

$$t1/2=\ln 2/C \qquad \text{(رابطهٔ ۲)}$$

برازش پروفیل گاز تولیدی برای تخمین فراسنجه‌های گاز تولیدی، با استفاده از رویهٔ NLIN نرم‌افزار SAS 9.2 (2003) انجام پذیرفت. برای اندازه‌گیری قابلیت هضم ظاهری (AIVDMD)[1] و واقعی مادهٔ خشک در شرایط آزمایشگاهی (TIVDMD)[2]، میزان آمونیاک تولیدی، غلظت کل اسیدهای چرب فرّار (TVFA)[3]، تعیین میزان ضریب تفکیک‌کننده(PF) [4]، تولید تودهٔ میکروبی (MPB)[5]، و بازده تولید میکروبی (EMP)[6] از آزمایش گاز ۲۴ساعته در یک دور جداگانه استفاده گردید (Blümmel *et al*., 1999). ۵۰۰ میلی‌گرم از هر کدام از نمونه‌ها توزین و به داخل سرنگ‌های شیشه‌ای مدرج با حجم ۱۰۰میلی‌لیتر منتقل و برای هر تیمار چهار سرنگ در نظر گرفته شد. تهیهٔ مایع شکمبه محلول بزاق مصنوعی همانند روش تولید گاز تا ۱۴۴ ساعت انجام پذیرفت. با این تفاوت که ۴۰ میلی‌لیتر از مخلوط نهایی به داخل سرنگ حاوی نمونه‌های خوراک تزریق شد (Makkar, 2010). پس از ۲۴ ساعت تولید گاز متوقف شد. محتویات سرنگ‌ها به داخل کیسه‌های داکرون با قطر منافذ ۴۰ میکرون که از قبل شماره‌گذاری و وزن‌کشی شده بودند، انتقال یافت. از مایع صاف‌شده به‌ازای هر سرنگ چهار تکرار داخل لوله‌های درپوش‌دار ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. دو تکرار برای اندازه‌گیری TVFA و دو تکرار نیز برای اندازه‌گیری آمونیاک استفاده شد. لوله‌های درپوش‌دار بعد از پرشدن از مایع صاف‌شده به فریزر با دمای ۲۰- درجه انتقال داده شد. کیسه‌های داکرون بعد از صاف‌شدن محتویات سرنگ‌ها به درون آنها، به آون انتقال داده شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک گردیدند. کیسه‌ها پس از ۴۸ ساعت از آون خارج شدند و وزن آن‌ها پس از سردشدن در دسیکاتور، ثبت گردید. سپس میزان قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک (گرم در هر کیلوگرم مادهٔ خشک) با رابطهٔ ۳ تعیین گردید (Talebzadeh *et al*., 2012):

(رابطهٔ ۳)

$$AIVDMD=\frac{(\text{وزن کیسه} - \text{وزن کیسه همراه با باقیمانده انکوباسیون})}{\text{۰/۰۱} \times \text{درصد ماده خشک} \times \text{وزن نمونه}}\times 1000$$

برای اندازه‌گیری قابلیت هضم واقعی مادهٔ خشک در شرایط برون‌تنی، کیسه‌ها به داخل بالن مخصوص منتقل شد. به هر بالن میزان ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول شویندهٔ خنثی (NDS)[7] اضافه شد. به بالن حاوی محلول شویندهٔ خنثی و نمونه‌ها یک گرم سولفیت سدیم

1. Apparent In Vitro Dry Matter Digestibility
2. True In Vitro Dry Matter Digestibility
3. Total Volatile Fatty Acids
4. Partitioning Factor
5. Microbial Biomass Production
6 .Efficiency Of Microbial Biomass Production
7. Neutral Detergent Solution

(به‌صورت جامد) و همچنین ۰/۵ میلی‌لیتر دکایدرونفتالین اضافه گردید. کیسه‌ها به‌مدت یک ساعت در محلول فوق جوشانده شد پس از گذشت یک ساعت عمل جوشیدن متوقف گردید و کیسه‌ها ابتدا با آب سرد و سپس سه بار با آب مقطر شستشو داده شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۶۰ درجه خشک گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت، کیسه‌ها از آون خارج و پس از سردشدن در دسیکاتور وزن آن‌ها ثبت شد. میزان قابلیت هضم واقعی مادهٔ خشک (گرم در هر کیلوگرم مادهٔ خشک) در شرایط برون‌تنی از رابطهٔ ۴ تعیین شد (Talebzadeh *et al.*, 2012):

(رابطهٔ ۴)

$$TIVDMD = \frac{(\text{وزن کیسه} - \text{وزن کیسه همراه با باقیمانده انکوباسیون شستشو با NDF})}{\text{وزن نمونه} \times \text{درصد ماده خشک} \times ۰/۰۱} \times 1000$$

ضریب تفکیک‌کننده (PF) با استفاده از نسبت سوبسترای تجزیه‌شده به‌طور حقیقی (TSD)[1] به گاز تولیدشده بعد از ۲۴ ساعت محاسبه شد (Blümmel *et al.*, 1999). میزان تولید تودهٔ میکروبی (MBP) و بازده تولید تودهٔ میکروبی (EMP) در شرایط برون‌تنی با روش ارائه‌شدهٔ Grings *et al.* (2005) محاسبه گردید. غلظت کل اسیدهای چرب فرّار با استفاده از دستگاه مارخام و طبق روش توصیف‌شده توسط Barnett & Reid (1957) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی از روش فنل‌ـهیپوکلریت استفاده شد (Broderick & Kang, 1980). تعداد پروتوزوآ براساس شیوهٔ توصیف‌شدهٔ Dehority (1993) شمارش گردید. بدین منظور از روش آزمایش گاز ۲۴ساعته در یک دور مجزا استفاده شد. ولی برخلاف روش قبل بعد از توقف تولید گاز نمونه‌های خوراک داخل سرنگ‌ها صاف نشد بلکه برای مخلوط‌شدن محتویات، سرنگ‌ها به‌خوبی تکان داده شدند و سپس حدود ۲۰ میلی‌لیتر از محتویات هر سرنگ به داخل لوله‌های فالکن ۵۰ میلی‌لیتر که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محلول فرمالین (۱۸۵ میلی‌لیتر فرمالدئید در یک لیتر آب مقطر) بود، منتقل شد. از هر سرنگ سه نمونه تهیه شد. با توجه به تثبیت نمونه‌ها در محلول فرمالین، شمارش پروتوزوآها یک هفته بعد از نمونه‌برداری صورت پذیرفت. برای شمارش پروتوزوآ از لامل مخصوص (Sedgwick-Rafter, Hawksley, UK) استفاده گردید. شمارش برای هر نمونه یک بار صورت پذیرفت. در صورتی‌که تعداد پروتوزوآها بیشتر از ۲۵۰ عدد بود، نمونهٔ رقیق می‌شد و مجدداً شمارش صورت می‌گرفت.

داده‌های حاصل از این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با رویهٔ MIXED نرم‌افزار SAS 9.2 (2003) آنالیز گردید. مدل استفاده‌شده در این طرح به‌صورت رابطهٔ ۵ بود:

$$Y_i = \mu + T_i + e_{ij}$$ (رابطهٔ ۵)

که در آن Y_i مشاهده iام از تیمار jام، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار iام، و e_{ij} اثر خطای مرتبط با مشاهدهٔ ij بود. در مدل اولیه اثر تصادفی دوره (روز آزمایش) در نظر گرفته شد. ولی به‌دلیل عدم معنی‌داری این اثر از مدل حذف شد. مقایسهٔ چنددامنه‌ای میانگین حداقل مربعات با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار محافظت‌شدهٔ فیشر انجام شد. برای گروه‌بندی میانگین تیمارها و اختصاص حروف تعیین‌کنندهٔ معنی‌داربودن اختلاف بین آن‌ها از گزینهٔ SAS pdmix800 macro (Saxton, 1998) استفاده شد. برای تمامی مقایسات، معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. مواد مغذی موجود در تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزهٔ خوزستانی (براساس مادهٔ خشک)

ME_p	خاکستر خام	CP	EE	ADF	NDF	ADL	NDICP	ADICP
۱/۰۸	۱۷/۱	۷/۰	۱/۵	۳۷/۶	۳۳/۰	۲۱/۷	۲/۱	۵/۱

ME_p: انرژی قابل متابولیسم محاسبه‌شده در سطح تولید (مگاکالری در هر کیلوگرم مادهٔ خشک)، NDF: لیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی (درصد)، ADF: الیاف نامحلول در شویندهٔ اسیدی (درصد)، ADL: لیگنین نامحلول در شویندهٔ اسیدی (درصد)، NDICP: مقدار پروتئین خام غیر محلول در شویندهٔ خنثی (درصد)، ADICP: مقدار پروتئین خام غیر محلول در شویندهٔ اسیدی (درصد)، EE: عصارهٔ اتری (درصد)، و CP: پروتئین خام (درصد).

1. True Substrate Degraded

جدول ۲. اجزای تشکیل‌دهندهٔ جیره‌های آزمایشی و محتوای مواد مغذی آنها (براساس مادهٔ خشک)

اقلام خوراکی (درصد مادهٔ خشک)	شاهد	۲۵ درصد مرزه	۵۰ درصد مرزه	۷۵ درصد مرزه	۱۰۰ درصد مرزه
جو	۵۹/۵	۵۴/۴	۵۳/۵	۵۳	۵۲
کنجالهٔ سویا	۷	۷	۸	۹	۹
سبوس گندم	۱۰	۱۶	۱۶	۱۵/۷	۱۶/۵
تفالهٔ مرزه	-	۵	۱۰	۱۵	۲۰
یونجه	۲۰	۱۵	۱۰	۵	-
نمک	۱	۱	۱	۱	۱
بی‌کربنات سدیم	۱	۱	۱	۱	۱
مکمل ویتامینی	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
جمع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
مواد مغذی					
انرژی قابل متابولیسم (Mcal/kgDM)	۲/۴۷	۲/۴۴	۲/۴۱	۲/۴	۲/۴۹
پروتئین (درصد)	۱۴/۷	۱۴/۷	۱۴/۷	۱۴/۷۵	۱۴/۷
کلسیم (درصد)	۰/۷۱۳	۰/۵۹۷	۰/۵۴	۰/۶۴۱	۰/۷۴۲
فسفر (درصد)	۰/۴۳	۰/۴۵۱	۰/۴۳	۰/۴۲۷	۰/۴۹
سدیم (درصد)	۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۱۸

نتایج وبحث

تولید گاز و فراسنجه‌های پویایی گاز

سطوح گوناگون تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزه بر تولید گاز در ساعات متفاوت بعد از انکوباسیون (جدول ۳) تأثیری نداشت (P>۰/۰۵)، اما با افزایش سطح تفالهٔ مرزه روند کاهشی در میزان تولید گاز مشاهده شد (P>۰/۰۵). کم‌ترین میزان تولید گاز برای جیرهٔ حاوی ۷۵ درصد تفالهٔ مرزه و بیشترین میزان تولید گاز برای تیمار شاهد ثبت شد. نتایج مندرج در جدول ۳ نشان می‌دهد که سطوح گوناگون جایگزینی تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزه تأثیر معنی‌داری بر مجانب تولید گاز (A)، سرعت تولید گاز (C)، و نیمه‌عمر تولید گاز ($t_{1/2}$) نداشت (P>۰/۰۵). در مقایسهٔ بین تیمارهای آزمایشی بیشترین میزان A ازنظر عددی مربوط به تیمار شاهد (۴۷۷/۹ میلی‌لیتر به‌ازای هر گرم مادهٔ آلی) و کمترین مقدار برای تیمار حاوی ۷۵ درصد تفالهٔ مرزه به‌جای یونجه (۳۵۵/۴ میلی‌لیتر به‌ازای هر گرم مادهٔ آلی) مشاهده شد. در زمینهٔ سرعت نسبی تولید گاز (C) نیز بیشترین مقدار ازنظر عددی در تیمار حاوی ۷۵ درصد تفالهٔ مرزه و کمترین مقدار در تیمار حاوی ۲۵ درصد تفاله مشاهده شد. بیش‌ترین مقدار نیمه‌عمر تولید گاز (t1/2) در تیمار حاوی ۲۵ درصد تفالهٔ مرزه و کمترین مقدار در تیمار حاوی ۵۰ درصد تفالهٔ مرزه مشاهده شد. تأثیرات مهارکنندگی اسانس‌های گیاهی بر تولید گاز در شرایط برون‌تنی را برخی از محققان بررسی کرده‌اند. در بررسی اثر سطوح گوناگون اسانس اکالیپتوس بر میزان تولید گاز یک جیرهٔ کاملاً مخلوط (۵۰ درصد کنسانتره: ۵۰ درصد علوفه)، تولید گاز با افزایش سطح اسانس اکالیپتوس کاهش یافت (Sallam *et al*., 2009). در مطالعهٔ دیگر توسط Kamalak *et al*. (2011)، افزودن ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تیمول باعث کاهش فراسنجهٔ a شد. افزایش مقدار اسانس نعناع اخضر در جیرهٔ پایه سبب کاهش حجم گاز تولیدی در زمان‌های گوناگون انکوباسیون شد؛ همچنین غلظت‌های بالای اسانس نعناع اخضر به‌شدت فراسنجه a و نرخ تولید گاز (c) را کاهش داد (Taghavi Nezhad *et al*., 2011). در پژوهش حاضر نیز فراسنجهٔ a در سطوح ۷۵ و۱۰۰ درصد جایگزینی تفالهٔ مرزه به‌جای یونجه در مقایسه با سایر تیمارها ازنظر عددی پایین‌تر بود که می‌تواند به‌علت مقادیر بالاتر اسانس در این سطوح جایگزینی باشد. میزان اسانس باقی‌مانده در تفالهٔ مرزه ۰/۶ درصد مادهٔ خشک بود (Khosravinia *et al*., 2013). با توجه به این مقدار به‌راحتی می‌توان محاسبه کرد که میزان اسانس در محیط کشت حاوی جیره‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، و ۱۰۰ درصد تفالهٔ مرزه به‌جای یونجه به‌ترتیب ۲۰، ۴۰، ۶۰، و ۸۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر بود.

در تحقیق Talebzadeh *et al*. (2012) افزودن مقادیر ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰، و ۶۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر اسانس آویشن شیرازی که همانند اسانس مرزهٔ خوزستانی، کارواکرول و تیمول اجزای اصلی تشکیل‌دهندهٔ آن هستند، به‌طور معنی‌داری باعث کاهش فراسنجهٔ a، سرعت نسبی تجزیه‌پذیری مادهٔ خشک، و تجزیه‌پذیری مؤثر مادهٔ خشک گردید، در حالی‌که زمان تأخیر تولید گاز و نیمه‌عمر گاز تولیدی افزایش یافت.

بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از تفالهٔ مرزه (حاوی ۰/۶ درصد اسانس) در سطوح استفاده‌شده در این پژوهش تأثیر منفی بر فراسنجه‌های ذکرشده نداشته است.

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین اثر سطوح گوناگون تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزهٔ خوزستانی بر تولید گاز (میلی‌لیتر به‌ازای هر گرم مادهٔ آلی) و فراسنجه‌های حاصل از تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی

	تیمارهای آزمایشی (درصد تفالهٔ مرزه)					SEM	P-Value
	صفر	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰		
زمان انکوباسیون (ساعت)							
۵	۲۲۵/۵۰	۲۰۸/۰۰	۱۹۸/۵۰	۱۷۳/۸۵	۱۸۹/۲۰	۱۴/۲۱۰	۰/۱۶۷۷
۱۴	۳۵۰/۰۰	۳۱۸/۵۰	۳۰۸/۵۰	۲۵۳/۰۰	۲۸۵/۰۰	۲۴/۴۴۰	۰/۱۱۵۸
۲۴	۴۰۵/۴۶	۳۷۴/۰۰	۳۵۰/۰۰	۳۰۳/۰۰	۳۲۶/۷۵	۳۱/۲۲۰	۰/۲۱۸۰
۵۱	۴۶۸/۷۵	۴۴۴/۷۵	۴۰۰/۷۵	۳۵۰/۰۰	۳۷۴/۰۰	۳۷/۷۳۰	۰/۲۰۴۹
۷۹	۴۹۰/۰۰	۴۶۹/۵۰	۴۱۷/۷۵	۳۶۹/۵۰	۳۹۱/۷۵	۴۰/۶۴۰	۰/۲۳۱۸
۱۲۰	۴۹۶/۵۰	۴۲۵/۲۵	۴۱۲/۲۰	۳۷۲/۷۵	۳۹۵/۲۵	۴۰/۱۹۰	۰/۲۰۳۹
۱۴۴	۴۹۶/۵۰	۴۷۵/۲۵	۴۲۵/۲۵	۳۷۲/۷۵	۳۹۵/۲۵	۴۰/۳۴۰	۰/۱۹۲۰
فراسنجه‌های پویایی گاز							
a	۴۷۴/۹۴	۴۵۳/۹۱	۴۰۶/۱۱	۳۵۵/۴۴	۳۷۸/۰۸	۳۹/۵۲۴	۰/۲۲۲۲
c	۰/۰۹۹۵	۰/۰۸۷۷	۰/۱۱۰۰	۰/۱۱۶۳	۰/۱۰۸۵	۰/۰۱۲۸۰	۰/۵۷۵۰
t1/2	۶/۹۸	۷/۳۹	۶/۴۲	۶/۶۵	۶/۴۶	۰/۵۵۷	۰/۳۲۶۹

a: مجانب تولید گاز (میلی‌لیتر گاز تولیدی به‌ازای هر میلی‌گرم مادهٔ آلی انکوباسیون‌شده)، C: سرعت نسبی تولید گاز (در هر ساعت)، t1/2: نیمه‌عمر تولید گاز (ساعت)، SEM: خطای معیار میانگین.

در هر ردیف میانگین‌های حداقل مربعات با حروف غیر مشترک اختلاف معنی‌دار دارند (P <۰/۰۵).

میزان تولید آمونیاک، غلظت کل اسیدهای چرب فرّار، و تعداد پروتوزوآ

جایگزینی بخشی از یونجهٔ جیره با تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزه، سبب کاهش میزان آمونیاک تولیدی شد (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری در تولید آمونیاک با افزایش سطوح تفالهٔ مشاهده نشد (جدول ۴). سطوح گوناگون تفالهٔ مرزه اثر معنی‌داری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرّار نداشت (جدول ۴)، هرچند با افزایش سطوح تفالهٔ مرزه روند کاهشی در تولید اسیدهای چرب فرّار مشاهده گردید. سطوح گوناگون تفالهٔ مرزه در جیره اثر معنی‌داری بر تعداد پروتوزوآ نداشت. محققان نشان دادند که اسانس آویشن شیرازی و نعناع اخضر با مهار گونه‌ای از باکتری‌های با توان بالای تولید آمونیاک[1]، میزان آمونیاک تولیدی را در شرایط برون‌تنی کاهش دادند که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مطابقت داشت (Taghavi Nezhad *et al.*, 2013). در پژوهشی دیگر افزودن مکمل اسانس بادیان رومی به جیرهٔ تلیسه‌های در حال رشد تغذیه‌شده با جیره‌های پرکنسانتره، اثر معنی‌داری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرّار نداشت، ولی غلظت نتیروژن آمونیاکی و تعداد پروتوزوآ را کاهش داد (Cardozo *et al.*, 2006) که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مطابقت داشت. McIntosh *et al.* (2003) نشان دادند که با خوراندن مخلوطی از اسانس‌های گیاهی به میزان یک گرم در روز، فعالیت پروتوزوآی مژکدار شکمبهٔ گاو شیری تحت تأثیر قرار نگرفت. در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که افزودن کاپسایسین (ترکیب فعال فلفل تند) در گاو گوشتی تغذیه‌شده با جیره‌های پرکنسانتره تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی نداشت (Cardozo *et al.*, 2006). همچنین استفاده از لیمونن و تیمول در دزهای بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و وانیلین و اوژنول در دزهای بالاتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تأثیری بر غلظت آمونیاک در محیط کشت پیوسته[2] نداشت (Castillejis *et al.*, 2006). Patra & Yu (2012) تأثیرات اسانس‌های میخک، اکالیپتوس، سیر، پونهٔ کوهی، و نعناع فلفلی را بر تخمیر شکمبه‌ای بررسی کردند. غلظت کل اسیدهای چرب فرّار با اسانس‌های سیر، اکالیپتوس، و نعناع فلفلی تحت تأثیر قرار نگرفت، اما تعداد پروتوزوآ با تمام اسانس‌ها کاهش یافت. اسانس پونهٔ کوهی و مادهٔ موثر اصلی آن کارواکرول در

1. Hyper Ammonia Producing Bacteria

2. Continuous Culture

غلظت‌های مشابه، از غلظت نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت بسته در شرایط برون‌تنی کاستند (Busquet *et al.*, 2006). به نظر می‌رسد کاهش میزان آمونیاک تولیدی با گنجاندن تفالهٔ مرزه در پژوهش حاضر نیز به‌دلیل وجود ترکیبات فعال فنلی آن به‌خصوص کارواکرول و تیمول باشد.

قابلیت هضم مادهٔ خشک، فاکتور تفکیک‌کننده، تولید، و بازده تولید تودهٔ میکروبی

فاکتور تفکیک‌کننده نشان‌دهندهٔ بخشی از سوبسترای تخمیرشده (در شرایط آزمایشگاهی) است که به‌جای استفاده در تولید گاز، در تولید تودهٔ میکروبی استفاده شده است (Blümmel *et al.*, 1999). بالاتربودن این فاکتور نشان‌دهندهٔ آن است که بخش بیشتری از سوبسترای قابل تخمیر در تولید تودهٔ میکروبی استفاده شده است. به بیان دیگر، این فاکتور نشان‌دهندهٔ تفاوت وابسته به سوبسترای بازده تولید تودهٔ میکروبی در شرایط آزمایشگاهی است (Blümmel *et al.*, 1999). افزودن تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزه به جیرهٔ بره به‌عنوان جایگزین بخشی از یونجه، اثر معنی‌داری بر میزان فاکتور تفکیک‌کننده نداشت (P>۰/۰۵). سطوح گوناگون تفالهٔ مرزه اثر معنی‌داری بر تولید تودهٔ میکروبی و بازده تولید میکروبی نداشت (P>۰/۰۵). نتایج این پژوهش نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی ازنظر قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک وجود داشت (جدول ۴). بیشترین میزان قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک در جیرهٔ حاوی ۲۵ درصد تفالهٔ مرزه به‌جای یونجه و کمترین میزان برای جیره‌ای بود که در آن تفالهٔ مرزه در سطح ۷۵ درصد جایگزین یونجه گردید (جدول ۴). برخلاف قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک، تفاوتی معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی ازنظر قابلیت هضم حقیقی مادهٔ خشک در شرایط برون‌تنی وجود نداشت (جدول ۴). قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک در شرایط برون‌تنی، با تعیین میزان سوبسترای باقی‌مانده پس از انکوباسیون که آلوده به بقایای میکروبی است، محاسبه می‌گردد. در چنین شرایطی آلودگی بقایای سوبسترا با تودهٔ میکروبی پس از پایان انکوباسیون می‌تواند باعث تخمین میزان قابلیت هضم کمتر از حد واقعی گردد. بنابراین هرچه میزان تودهٔ میکروبی تولیدشده بیشتر باشد، میزان قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک کمتر از مقدار حقیقی تخمین‌زده می‌شود. در پژوهش حاضر، میزان تودهٔ میکروبی تولیدشده در جیره‌های حاوی ۵۰ و ۷۵ درصد تفالهٔ مرزه به‌جای جو بالاتر از جیرهٔ شاهد بود (جدول ۴) و به همین دلیل میزان قابلیت ظاهری مادهٔ خشک این جیره‌ها کمتر از جیرهٔ شاهد بود. پس از تصحیح میزان سوبسترای باقی‌مانده برای پروتئین میکروبی این تفاوت از بین رفت، به گونه‌ای که تفاوتی بین جیره‌های آزمایشی ازنظر قابلیت هضم واقعی مادهٔ خشک در شرایط برون‌تنی مشاهده نشد (جدول ۴).

جدول ۴. تأثیر جیره‌های آزمایشی بر تعداد پروتوزوآ ($۱۰^۴$به‌ازای هر میلی‌لیتر)، فراسنجه‌های تخمیر، قابلیت هضم ظاهری و حقیقی مادهٔ خشک در شرایط آزمایشگاهی، ضریب تفکیک‌کننده، تولید تودهٔ میکروبی، و بازده تولید تودهٔ میکروبی

	تیمارهای آزمایشی (درصد تفالهٔ مرزه)					SEM	P-Value
	صفر	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰		
NH_3-N	۱۹/۵۶۸^{a}	۱۷/۱۲۹^{b}	۱۷/۴۸۷^{b}	۱۶/۷۱۲^{b}	۱۷/۰۶۴^{b}	۰/۷۴۸	۰/۰۰۰۱
TVFA	۷۹/۷۵	۸۰/۹۴	۷۵/۰۶	۸۴/۰۸	۷۱/۶۸	۳/۴۵۶	۰/۷۴۳۹
پروتوزوآ	۰/۰۸۱۳	۰/۱۰۹۴	۰/۲۰۹۴	۰/۱۹۳۸	۰/۱۵۶۳	۰/۰۵۳۰	۰/۰۵۵۸
PF	۴/۳۷	۴/۷۳	۵/۱۹	۵/۳۰	۴/۳۹	۰/۲۸۰	۰/۱۰۴۲
MPB	۱۹۷/۱۴	۲۲۴/۷۵	۲۴۶/۴۲	۲۴۱/۳۹	۱۹۰/۹۲	۱۵/۶۱۰	۰/۰۸۸۵
EMP	۰/۴۶	۰/۵۰	۰/۵۴	۰/۵۵	۰/۴۶	۰/۰۲۸	۰/۰۹۷۴
AIVDMD	۰/۷۹^{ab}	۰/۸۴^{a}	۰/۷۴^{bc}	۰/۶۰^{d}	۰/۶۹^{c}	۰/۰۳۰	۰/۰۰۱۰
TIVDMD	۰/۸۵	۰/۸۹	۰/۹۰	۰/۸۸	۰/۸۲	۰/۰۲۴	۰/۱۷۳۳

TVFA: کل اسیدهای چرب فرّار (میلی‌مول در هر لیتر)، NH_3-N: نیتروژن آمونیاکی (میلی‌مول در هر لیتر)، PF: ضریب تفکیک‌کننده، MPB: تولید تودهٔ میکروبی (میلی‌گرم)، EMP: بازده تولید میکروبی (میلی‌گرم به‌ازای هر گرم مادهٔ خشک قابل هضم)، IVDMD : قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک به روش آزمایشگاهی (گرم در هر گرم مادهٔ خشک) ، TIVDMD: قابلیت هضم حقیقی مادهٔ خشک به روش آزمایشگاهی (گرم در هر گرم مادهٔ خشک).

در هر ستون میانگین‌های حداقل مربعات با حروف غیر مشترک، اختلاف معنی‌دار دارند (P <۰/۰۵).

Taghavi Nezhad *et al.* (2011) اثر سطوح گوناگون اسانس نعناع اخضر (۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، و ۱۰۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) بر میزان PF، تولید تودهٔ میکروبی، قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک، و واقعی مادهٔ آلی به روش آزمایشگاهی را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که در سطح ۲۵۰ و۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس نعناع اخضر میزان PF، قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک، و قابلیت هضم واقعی مادهٔ آلی افزایش یافت، ولی در سطح ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فراسنجه‌های فوق با کاهش مواجه شدند. در تأیید یافته‌های فوق، در پژوهش حاضر میزان PF، تولید تودهٔ میکروبی، قابلیت هضم ظاهری و واقعی مادهٔ خشک در شرایط آزمایشگاهی با سطوح پایین اسانس موجود در تفالهٔ مرزه افزایش نشان داد. کارواکرول در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر و اوژنول در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر قابلیت هضم ظاهری مادهٔ خشک به روش آزمایشگاهی را کاهش دادند (Benchaar *et al* ., 2007). در بررسی تأثیرات فلاونوئیدها بر فعالیت تخمیر شکمبه، تولید متان، و جمعیت میکروبی، مشخص گردید که اکثر فلاونوئیدها بازده سنتز میکروبی را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند (Oskouiean *et al*., 2013). همچنین گزارش شده است که گیاهان حاوی ساپونین‌ها توانایی بالایی برای تبدیل قسمت بیشتری از سوبسترا به تودهٔ میکروبی دارند (Jayanegara, 2010). در عین حال در مطالعهٔ حاضر، گنجاندن تفالهٔ مرزه در جیره‌های پرکنسانترهٔ بره‌های پرواری تأثیری بر تولید تودهٔ میکروبی و بازده تولید آن نداشت، ولی جایگزینی تفالهٔ مرزه به‌جای یونجه تا سطح ۷۵ درصد بازده تولید تودهٔ میکروبی را ازنظر عددی افزایش داد (جدول ۴)، که می‌تواند ناشی از کاهش دآمیناسیون اسیدهای آمینه و درنتیجه کاهش در میزان آمونیاک تولیدی (جدول ۴) و یا هیدرولیز پپتیدها بوسیلهٔ ترکیبات فعال موجود در اسانس تفالهٔ مرزه باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن تفالهٔ اسانس‌گیری‌شدهٔ مرزهٔ خوزستانی به جیره‌های پرکنسانترهٔ بره‌های پرواری می‌تواند با کاهش میزان تولید نیتروژن آمونیاکی، بدون تأثیر سوء بر قابلیت هضم مادهٔ خشک، بازدهی استفاده از نیتروژن جیره را بهبود بخشد.

REFERENCES

1. Barnett A.J.G. & Reid, R.L. (1957**).** Studies on production of volatile fatty acids from grass by rumen liquid in an artificial rumen. *Journal of Agricultural Science (Cmabridge)*, 48, 315-321.
2. Benchaar C., Petit H.V., Berthiaume R., Ouellet D.R., Chiquette J. & Chouinard P.V. (2007). Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, ruminal microbial populations, milk production and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science*, 90, 886-897.
3. Blümmel M., Schröder A., Südekum K.-H, & Becker K. (1999). Estimating ruminal microbial efficiencies in silage-fed cattle: comparison of an *in vitro* method with a combination of *in situ* and *in vivo* measurements. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 81, 57-67.
4. Broderick G.A. & Kang J.H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Animal Feed Science and Technology*, 63, 64-75.
5. Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A. & Kamel C. (2006). Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89, 761-771.
6. Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L. & Ferret A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90: 2580-2595.
7. Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A. & Kamel C. (2005). Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high concentrate diet for beef cattle. *Journal of Dairy Science*, 83, 2572-2579.
8. Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A. & Kamel C. (2006). Effects of alfalfa extract, anise, capsicum and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*, 84, 2801-2808.
9. Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A. & Losa R. (2005). Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*, 119, 29-41.

10. Castillejos L., Calsamiglia S. & Ferret A. (2006). Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *Journal of Dairy Science*, 89, 2649-2658.
11. Dehority B.A. (1993). *Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa*. Florida: CRC Press.
12. European Commission. (2003). Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. Off. *Journal of European Union*, L:L268/29–L268/43.
13. Grings E.E., Blümmel M. & Südekum K.H. (2005). Methodological considerations in using gas production techniques for estimating ruminal microbial efficiencies for silage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 527-545.
14. Jayanegara A., Goel G., Makkar H.P.S. & Becker K. (2010). Reduction in methane emissions from ruminants by plant secondary metabolites: Effects of polyphenols and saponins sustainable improvement of animal production and health. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*, 2010, 151–157.
15. Kamalak A., Canbolat O, Atalay A.A.I. & Ozkan C.O. (2011). Effect of Thymol on *in vitro* gas production, digestibility and metabolizable energy content of alfalfa hay. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 17, 211-216.
16. Kamra D.N., Agarwal N. & Chaudhary L.C. (2005). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary plant compounds. In: Proceedings of the international conference of greenhouse gases and animal agriculture. ETH Zurich, Zurich , Switzerland, pp.102-111.
17. Khosravinia H., Ghasemi S. & Rafiei Alavi E. (2103). Effect of savory (*Satureja khuzistanica*) essential oils on performance, liver and kidney functions in broiler chicks**.** *Journal of Animal and Feed Sciences*, 22, 50-55.
18. Makkar, H.P.S., 2010. *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C. (Eds.), *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, the Netherlands, pp. 107–144.
19. Menke K.H. & Steingass H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28, 7–55.
20. McGuffey R.K., Richardson L. F. & Wilkinson J.I.D. (2001). Ionopher for dairy cattle: current status and future outlook. *Journal of Dairy Science*, 84, 194-203.
21. McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace R.J., Beever D.A. & Newbold C.J. (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 5011-5014.
22. NRC. (1985). *Nutrient Requirements of Sheep* (6th ed.). Washington, DC: National Academy Press.
23. Ørskov E.R. & McDonald I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal Agricultural Science* ,92,499-504.
24. Oskoueian E., Norhani A. & Oskoueian A. (2013). Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial production. *Biomed Research International*, 2013, 1-8.
25. Patra A.K. & Yu Z. (2012). Effects of essential oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, 78, 4271-4280.
26. Sallam S.M.A., Bueno I.C.S, Brigide P., Godoy P.B., Vitti D.M.S.S. & Abdalla A. L. (2009). Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *Options Méditerranéennes*,85, 267-272.
27. Saxton A.M. (1998). A macro for converting mean separation output to letter groupings in Proc Mixed. In: Proceedings of 23rd SAS Users Group Intl., *SAS Institute*, Cary, USA, pp.1243-1246.
28. Schelling G.T. (1984). Monensin mode of action in the rumen. *Journal of Animal Science*, 58, 1518-1527.
29. Taghavi Nezhad M., Alipour D., Torabi Goudarzi M., Zamani P. & Khodakaramian G. (2011). Dose response to Carvone rich essential oils of spearmint (*Mentha spicata* L.): *in vitro* ruminal fermentation kinetics and digestibility. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 1013-1020. (In Farsi)
30. Taghavi Nezhad M., Alipour D., Flythe M.D., Zamani P. & Khodakaramian G. (2013). The effect of essential oils of *Zataria multiflora* and *Mentha spicata* on the *in vitro* rumen fermentation, and growth and deaminative activity of amino acid-fermenting bacteria isolated from Mehraban sheep. *Animal Production Science*, 54, 299-307.
31. Talebzadeh R., Alipour D., Saharkhiz M.J., Azarfar A. & Malecky M. (2012). Effect of essential oils of Zataria multiflora on in vitro rumen fermentation, protozoal population, growth and enzyme activity of anaerobic fungus isolated from Mehraban sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 115-124.