**علوم دامی ایران**
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۴ (ص ۲۴۶-۲۳۵)

# مطالعهٔ آزمایشگاهی تأثیرات اسانس روغنی پونهٔ کوهی (*Origanum vulgare*) در سطوح مختلف بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، متان تولیدی و کنترل اسیدوز شکمبه‌ای القاشده

**شهین یادگاری[۱]، مصطفی ملکی[۲*]، پویا زمانی[۳] و مهدی دهقان بنادکی[۴]**
**۱، ۲ و ۳. کارشناس ارشد، استادیار، دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان**
**۴. دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران**
**(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۵/۲۱)**

## چکیده

**هدف از تحقیق حاضر، بررسی آزمایشگاهی تأثیرات اسانس روغنی پونهٔ کوهی در دوزهای مختلف (۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر کینتیک تولید گاز، برخی فراسنجه‌های هضم و تخمیر شکمبه، تولید متان و همچنین تعیین پتانسیل آن در کنترل اسیدوز شکمبه‌ای در قالب آزمایشی چهار مرحله‌ای بود. در مرحلهٔ اول به موازات افزایش دوز اسانس، حداکثر گاز تولیدی (A) و نرخ تولید گاز (b) به‌صورت غیرخطی و فاز تأخیر (L) به‌صورت خطی تغییر کردند که حداکثر مقدار A و b و حداقل مقدار L در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس مشاهده شد. در آزمایش دوم، قابلیت هضم حقیقی مادهٔ خشک (IVTDMD) و آلی (IVTOMD) و غلظت کل اسیدهای چرب فرار (TVFA) در دوزهای بالای ۵۰۰ کاهش یافتند. با این حال، مقدار گاز تولیدی بعد از ۲۴ ساعت و تودهٔ میکروبی (MB) با افزایش دوز اسانس تا ۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافتند. همچنین نسبت مولی استات و پروپیونات در دوزهای بالای ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، کاهش و نسبت بوتیرات افزایش یافت. استفاده از اسانس پونهٔ کوهی موجب کاهش غیرخطی مقدار و درصد متان تولیدی شد، اما هیچ‌کدام از سطوح استفاده‌شده، در کنترل اسیدوز شکمبه‌ای تأثیری نداشت.**

**واژه‌های کلیدی:** **اسانس روغنی، اسیدوز شکمبه‌ای، تولید گاز، تولید متان.**

## مقدمه

امروزه نقش نشخوارکنندگان در تأمین نیازهای انسان بر کسی پوشیده نیست. با وجود این، پایین‌بودن بازده استفاده از مواد مغذی جیره‌ای در شکمبه، موجب هدرروی ۱۲-۲ درصد از انرژی خام خوراک به شکل متان (Beauchemin & McGinn, 2006) و همچنین دفع بخش شایان‌توجهی از محتوی نیتروژن خوراک، به‌طور عمده به شکل اوره و اکسید نیتروژن (Firkins *et al.*, 2007) می‌شود. در میان راهکارهای ارائه‌شده جهت بهبود بازده هضم و تخمیر شکمبه، استفاده از اسانس‌های روغنی به‌عنوان جایگزینی سبز برای برخی از افزودنی‌های خوراکی ازجمله آنتی‌بیوتیک‌ها، توجه بسیاری از محققان علم تغذیهٔ دام را در سال‌های اخیر به خود جلب کرده است (Bodas *et al.*, 2012). در این راستا، تحقیقات گسترده‌ای دربارهٔ اسانس‌های روغنی انجام گرفته است (Benchaar *et al.*, 2008; Malecky *et al.*, 2009; Talebzadeh *et al.*, 2013) که نتایج آن‌ها برحسب نوع اسانس روغنی، ترکیب

* تلفن: ۸۱۳-۴۴۲۴۰۹۰
E-mail: malecky@agroparistech.fr, mmalecky@basu.ac.ir

مواد مؤثره، دوز استفاده‌شده و همچنین نوع جیره متفاوت بوده است (Calsamiglia *et al.*, 2007; Dorman & Deans, 2000). در این زمینه گزارش‌های متعدد، از تأثیرات متفاوت اسانس‌های روغنی بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه حاکی است؛ در برخی موارد تأثیرات افزایشی (Cardozo *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2005) در برخی موارد تأثیرات کاهشی (Kumar *et al.*, 2009) دیده شده و در برخی موارد نیز هیچ اثری مشاهده نشده است (Meyer *et al.*, 2009). به همین ترتیب، تأثیرات متفاوتی از اسانس‌های روغنی بر الگوی تخمیر شکمبه گزارش شده است؛ به‌طوری‌که در هنگام استفاده از آن‌ها نسبت استات به پروپیونات در برخی موارد افزایش (Busquet *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2006) و در برخی موارد کاهش (Cardozo *et al.*, 2005) یافته است و در برخی موارد دیگر تحت تأثیر قرار نگرفته است (Newbold *et al.*, 2004). با این‌حال، در بیشتر این تحقیقات تولید متان شکمبه‌ای، تحت تأثیر این افزودنی‌ها کاهش یافته است (Jahani-Azizabadi *et al.*, 2011; Patra, 2011). باوجود بسیاری تحقیقات در این زمینه، بخش شایان توجهی از آن‌ها مربوط به آزمایش‌های غربالگری، با تعداد بالای نمونه‌های گیاهی یا فراورده‌های مستخرج از آن‌ها، با هدف پیداکردن ترکیباتی با منشأ گیاهی و دارای قابلیت ایجاد تغییر مثبت در الگوی تخمیر شکمبه بوده است (Bodas *et al.*, 2012)؛ بنابراین نتایج این تحقیقات اولیه برای تأیید تأثیرات کاندیداهای یافت‌شده و همین‌طور تعیین دوز مناسب به بررسی بیشتر با استفاده از آزمایش‌های با دقت و جزئیات بیشتر، نظیر آزمایش‌های پاسخ به دوز نیاز دارند (López *et al.*, 2010).

پونهٔ کوهی (*Origanum vulgare*) از گیاهان معطری است که در بیشتر مناطق کشور یافت می‌شود. پروفایل ترکیبات مؤثرهٔ اسانس روغنی این گیاه به‌طور عمده شامل (برحسب درصد) کارواکرول (۶۲-۱۶/۷)، پ-سیمن(۱۵/۵-۱۱/۵)، گاما- ترپینن (۱۱/۴-۴/۸) و تیمول (۳۲/۴-۰/۴۴) است (Baratta, *et al.*, 1998; Viuda-Martos *et al.*, 2007) که بسته به موقعیت جغرافیایی و مرحلهٔ فنولوژیکی گیاه می‌تواند متفاوت باشد. در برخی از تحقیقات غربالگری، تأثیرات مفیدی همچون کاهش تولید گاز متان (Chaves *et al.*, 2012) و افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار (Castillejos *et al.*, 2008) در شکمبه، برای عصاره و اسانس روغنی آن گزارش شده است. با توجه به تأثیرات ضدمیکروبی انتخابی بسیاری از اسانس‌های روغنی بر میکروب‌های شکمبه، احتمال اثربخشی برخی از آن‌ها در کنترل اسیدوز شکمبه‌ای دور از انتظار نیست؛ با این حال، در این زمینه به‌جز موارد بسیار اندک (Hutton *et al.*, 2012)، دربارهٔ بیشتر اسانس‌های روغنی، از جمله اسانس پونهٔ کوهی اطلاعاتی وجود ندارد. در نتیجه بررسی این جنبه از تأثیرات اسانس‌های روغنی نیز می‌تواند دارای اهمیت باشد؛ بنابراین هدف از تحقیق حاضر بررسی جامع‌تر تأثیرات اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر کینتیک تولید گاز، ظرفیت هضم و تخمیر شکمبه، تولید متان و همچنین مطالعهٔ پتانسیل آن در کنترل اسیدوز شکمبه، با استفاده از آزمایش‌های پاسخ به دوز در شرایط آزمایشگاهی بود.

## مواد و روش‌ها

**مراحل آزمایش، تیمارهای آزمایشی و سوبسترای تخمیر**

تحقیق حاضر در آزمایشی چهار مرحله‌ای انجام گرفت؛ بدین شکل که تأثیرات اسانس روغنی پونهٔ کوهی در دوزهای مختلف بر پویایی تولید گاز در شکمبه، برخی شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه، تولید متان و همچنین پتانسیل آن در پیشگیری از اسیدوز شکمبه‌ای، به ترتیب در مراحل اول تا چهارم بررسی شد. سطوح مختلف اسانس روغنی پونهٔ کوهی شامل صفر میلی‌گرم بر لیتر (شاهد)، ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (دوز پایین)، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (دوز متوسط)، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر محیط کشت (دوزهای بالا)، سطوح تیماری آزمایش در نظر گرفته شدند. سوبسترای تخمیر استفاده‌شده در تمامی آزمایش‌ها به‌جز آزمایش آخر، یک جیرهٔ نگهداری برای قوچ‌های بالغ بود که در تغذیهٔ دام‌های تأمین‌کنندهٔ مایع شکمبه استفاده شد. جیرهٔ آزمایشی (بر اساس مادهٔ خشک) از

۵۰ درصد یونجهٔ خشک، ۷ درصد کاه گندم، ۳۷ درصد جو، ۴ درصد کنجالهٔ تخم پنبه، ۱ درصد نمک و ۱ درصد پرمیکس معدنی-ویتامینی تشکیل شده بود. ترکیب شیمیایی جیرهٔ آزمایشی نیز (درصد از مادهٔ خشک) شامل ۹۲/۵ درصد مادهٔ آلی، ۱۲/۲ درصد پروتئین خام، ۳۵/۴ درصد فیبر نامحلول در شویندهٔ خنثی و ۴/۳ درصد عصارهٔ اتری بود.

**تهیهٔ اسانس روغنی پونهٔ کوهی**

اسانس روغنی پونهٔ کوهی (*Origanum vulgare*) از شرکت باریج‌اسانس (باریج‌اسانس، کاشان) تهیه شد. اسانس روغنی در ابتدا و پس از حل‌کردن در اتانول خالص، با استفاده از آب دیونیزه رقیق شد و در غلظت‌های اشاره‌شده در محیط کشت نهایی استفاده گردید.

**دام‌ها و مایع شکمبه**

مایع شکمبه از سه رأس گوسفند نر نژاد مهربان مجهز به فیستولای شکمبه‌ای، قبل از خوراک‌دهی نوبت صبح تهیه شد. بعد از مخلوط‌کردن نمونه‌های گرفته‌شده، مایع شکمبه با استفاده از پارچهٔ متقال چهارلایه صاف شد و با استفاده از یک فلاسک عایق حرارتی که از قبل گرم شده بود، به آزمایشگاه منتقل گردید و تا شروع آزمایش تحت جریان گاز دی‌اکسید کربن در دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

**آزمون تولید گاز**

آزمون تولید گاز مطابق روش Menke & Steingass (1988) انجام گرفت. به‌طور خلاصه یک نمونهٔ معرف از جیرهٔ تغذیه‌شده به قوچ‌ها (سوبسترای تخمیر) در آسیاب با الک ۱ میلی‌متری آسیاب شد. در آزمایش اول، ۲۰۰ میلی‌گرم (برحسب مادهٔ خشک) از جیرهٔ آزمایشی در سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری (هابرله فورتون، آلمان) ریخته شد و ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبهٔ بافری‌شده (به نسبت ۲ به ۱ بافر: مایع شکمبه، مطابق Menke & Steingass (1979) و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اسانس روغنی پونهٔ کوهی، به‌طوری‌که تأمین‌کنندهٔ دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر محیط کشت باشد، به آن اضافه شد (سه تکرار برای هر تیمار). همچنین سه سرنگ شیشه‌ای حاوی مایع شکمبهٔ بافری‌شده و بدون سوبسترا و اسانس روغنی، به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد. انکوباسیون سرنگ‌های شیشه‌ای در حمام آبی با دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۴۴ ساعت انجام گرفت و گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت اندازه‌گیری شد. در آزمایش دوم، ۵۰۰ میلی‌گرم از سوبسترای تخمیر (جیرهٔ تغذیه‌شده به قوچ‌ها) با ۴۰ میلی‌لیتر از مایع شکمبهٔ بافری شده و دوزهای صفر،۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از اسانس روغنی پونهٔ کوهی در سه تکرار و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد (Makkar *et al.*, 1995). در پایان انکوباسیون، تمامی محتویات سرنگ‌ها به لوله‌های فالکون انتقال یافت و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت g ×۵۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی از آن جدا شد. نمونه‌های ۴ میلی‌لیتری از آن با ۱ میلی‌لیتر اسید ارتوفسفریک ۲۵ درصد مخلوط شد و برای تعیین محتوی آمونیاک و اسیدهای چرب فرار در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. باقیماندهٔ هضم نشدهٔ سوبسترا در لوله‌ها، ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شد و وزن آن‌ها تعیین گردید. بقایای خشک‌شده، ۱ ساعت در محلول شویندهٔ خنثی جوشانده شد و با استفاده از پارچهٔ پلی‌استر (با قطر منافذ ۴۰ میکرومتر) صاف شده و دوباره به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شد و مقدار هضم حقیقی مادهٔ خشک سوبسترا (IVTDMD) تعیین گردید. مقدار هضم حقیقی مادهٔ آلی (IVTOMD) بعد از تعیین محتوی خاکستر بقایای خشک حاصل از مرحلهٔ قبل برآورد شد. در مرحلهٔ دوم نیز سه سرنگ شیشه‌ای حاوی مایع شکمبه و بدون سوبسترا و اسانس روغنی به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد.

**اندازه‌گیری متان تولیدی**

متان تولیدی مطابق با روش Fievez *et al.* (2005) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم نمونهٔ

آزمایشی با ۱۵ میلی‌لیتر مایع شکمبهٔ بافری‌شده (به دلیل محدودیت حجم سرنگ‌های شیشه‌ای) به همراه دوزهای آزمایشی (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از اسانس روغنی پونهٔ کوهی در سرنگ‌های شیشه‌ای به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. بعد از اتمام انکوباسیون و ثبت مقدار گاز تولیدی، مقدار ۲/۴ میلی‌لیتر سود (۱۰ مولار) به محتویات سرنگ‌ها اضافه شد و بعد از اتمام روند کاهشی، مقدار گاز تولیدی به دلیل جذب گاز دی‌اکسید کربن توسط سود و مقدار گاز باقیمانده در سرنگ به‌عنوان متان اندازه‌گیری شد.

**تعیین اثر اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر اسیدوز شکمبه‌ای**

این مرحله از آزمایش به روش Hutton *et al.* (2010) انجام گرفت. در این آزمایش دو سوبسترا برای انکوباسیون استفاده شد: کاه جوِ آسیاب‌شده در اندازهٔ ۱ میلی‌متر به‌عنوان سوبسترای معمول و منبع تولید گاز و دی-گلوکز به‌عنوان سوبسترای مورداستفاده برای باکتری‌های تولیدکنندهٔ اسیدلاکتیک. در این آزمایش ۱۰۰ میلی‌گرم کاه جو به همراه یک گرم دی-گلوکز با ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبهٔ تازه (گرفته‌شده در ۳ ساعت بعد از خوراک‌دهی نوبت صبح) و دوزهای مختلف اسانس روغنی (۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در لوله‌های ۲۰ میلی‌لیتری (بلکو، ایتالیا) در سه تکرار و به مدت شش‌ساعت کشت داده شد. همچنین سه گروه لوله‌های سه‌تایی شامل شاهد (فقط حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم کاه جو)، اسیدوز کنترل‌نشده (حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم کاه جو به همراه یک گرم دی-گلوکز) و شاهد مثبت (حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم کاه جو به همراه یک گرم دی-گلوکز و آنتی‌بیوتیک ویرجینیا مایسین با غلظت نهایی ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر) با ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبهٔ تازه همراه با گروه‌های تیماری کشت داده شد. در این میان، سه لولهٔ حاوی ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه و بدون سوبسترا به‌عنوان بلانک استفاده شد. مقدار گاز تولیدی در فواصل زمانی ۲ ساعته اندازه‌گیری شد و در انتها، پس از ثبت نهایی گاز تولیدشده، در لوله‌ها باز شد و pH نمونه‌ها ثبت گردید.

**آنالیزهای شیمیایی**

مادهٔ خشک، مادهٔ آلی، محتوی پروتئین خام، خاکستر خام و عصارهٔ اتری مطابق با روش‌های AOAC (AOAC, 2000) اندازه‌گیری شد. محتوی فیبر نامحلول در شویندهٔ خنثی مطابق با Van Soest *et al.* (1991)، محتوی آمونیاک با استفاده از روش فنل-هیپوکلریت (Broderick & Kang, 1980) و محتوی اسیدهای چرب فرار با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف (GC-FID, PU4410-PHILIPS) و مطابق با روش (Ottenstein & Bartley 1971) اندازه‌گیری گردید. برای این منظور بعد از ذوب نمونه‌ها در دمای محیط، ۱ میکرولیتر از نمونه به ستون تزریق شد. دمای محل تزریق (injector) و تشخیص (detector) ۲۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود. دمای اولیهٔ ستون ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود که با افزایش ۵ درجهٔ سانتی‌گراد در دقیقه، به ۱۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد افزایش یافت و در مرحلهٔ بعد با افزایش ۹ درجهٔ سانتی‌گراد در دقیقه، به ۲۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد رسید و ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد. همچنین از گاز نیتروژن به‌عنوان حامل با نرخ جریان ۳۵ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد.

**برآوردها و محاسبات آماری**

در ادامه داده‌های مربوط به گاز تولیدی در ساعات مختلف در مرحلهٔ اول آزمایش بر اساس مدل پیشنهادی توسط France *et al.* (1993)، برازش شد و پارامترهای کینتیک تولید گاز برآورد شد:

$$GP = A\left\{1 - e^{-[b(t-L)]}\right\}$$

در این مدل GP، گاز تولیدی تجمعی در زمان t (میلی‌لیتر بر گرم مادهٔ آلی)، A، حداکثر گاز تولیدی (میلی‌لیتر بر گرم مادهٔ آلی)، b، نرخ تولید گاز (بر ساعت) و L، فاز تأخیر (ساعت) هستند.

همچنین در مرحلهٔ دوم، نسبت مادهٔ آلی هضم‌شدهٔ حقیقی (میلی‌گرم) به حجم گاز تولیدی (میلی‌لیتر) بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون به‌عنوان فاکتور تفکیک (PF) برآورد شد (Blummel *et al.*, 1997a) و اختلاف وزنی بین بقایای هضم‌نشدهٔ سوبسترا در انتهای

انکوباسیون (به‌صورت مادهٔ خشک) و مقدار باقیمانده بعد از شستشو در محلول شویندهٔ خنثی به‌عنوان تودهٔ میکروبی (MB) در نظر گرفته شد (Blummel *et al.*, 1997b).

داده‌های به‌دست‌آمده اعم از مؤلفه‌های اندازه‌گیری‌شده و شاخص‌های برآوردشده، با استفاده از مدل زیر و به کمک رویهٔ GLM نرم‌افزار SAS (SAS, 2002) تجزیه و تحلیل آماری شدند:

$$Y_{ij}= \mu + Ti + e_{ij}$$

در این مدل $Y_{ij}$، مشاهده؛ $\mu$، اثر میانگین؛ $T_i$، اثر دوز اسانس (تیمار) و $e_{ij}$، خطای آزمایشی هستند. برای بررسی روند تأثیرات دوز اسانس (خطی و درجهٔ دو) بر مؤلفه‌ها، از آنالیز چندجمله‌ای اورتوگونال استفاده شد. در صورت معناداربودن اثر تیمار، مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح معناداری ۵ درصد انجام گرفت.

## نتایج و بحث

### اثر اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر کینتیک تولید گاز

استفاده از اسانس روغنی پونهٔ کوهی در سطوح مختلف در محیط کشت میکروبی موجب تغییر در فراسنجه‌های پویایی گاز تولیدی شد (جدول ۱). با افزایش سطح اسانس، حداکثر گاز تولیدی (A) در ابتدا تا سطح ۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش غیرمعنادار و سپس در بالاترین سطح اسانس کاهش یافت (P<۰/۰۵). با این حال، نرخ تولید گاز (b) با افزایش سطح اسانس از روند خطی (P<۰/۰۵) و درجهٔ دو (P<۰/۰۵) پیروی کرد؛ به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین مقدار آن در بالاترین سطح اسانس به دست آمد. در این میان، تغییرات مؤلفهٔ L در مجموع از روندی خطی برخوردار بود (P<۰/۰۵) که بیشترین مقدار آن در سطح ۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس مشاهده شد.

جدول ۱. اثر اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر مؤلفه‌های کینتیک تولید گاز شکمبه‌ای

| مؤلفه | دوز اسانس روغنی پونهٔ کوهی (میلی‌گرم بر لیتر) | | | | | SEM | P-value | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | صفر | ۲۵۰ | ۵۰۰ | ۷۵۰ | ۱۰۰۰ | | خطی | درجه دو |
| A | ۳۳۸/۴ ab | ۳۷۵/۰ a | ۳۶۷/۰ a | ۳۵۲/۰ ab | ۳۱۹/۴ b | ۱۲/۵۶ | ۰/۱۷۱ | ۰/۰۱۴ |
| B | ۰/۰۸ ab | ۰/۰۹ a | ۰/۰۷ bc | ۰/۰۶ c | ۰/۰۳ d | ۰/۰۰۵ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۱۱ |
| L | ۰/۴۱ b | ۰/۲۴ b | ۰/۴۸ ab | ۰/۷۹ a | ۰/۵۳ ab | ۰/۱۰۶ | ۰/۰۴۹ | ۰/۷۸۸ |

A. حداکثر گاز تولیدی (پتانسیل تولید گاز) (میلی‌لیتر بر گرم مادهٔ آلی)؛ b. نرخ تولید گاز (بر ساعت)؛ L. فاز تأخیر (ساعت).
حروف غیرمشترک در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنادار است (P< ۰/۰۵).

با توجه به اینکه تولید گاز، شاخصی از تخمیر شکمبه‌ای است (Menke *et al.*, 1979)، می‌توان اذعان داشت که در مرحلهٔ اول آزمایش، هم مقدار و هم نرخ تخمیر به‌طور غیرخطی به‌موازات افزایش سطح اسانس تحت تأثیر قرار گرفت. با این حال، باوجود کاهش معنادار نرخ تولید گاز در سطوح بالاتر از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، روند کاهشی حداکثر گاز تولیدی از شیب ملایم‌تری برخوردار بود. در این زمینه می‌توان گفت که با وجود کاهش نرخ تولید گاز، مدت زمان طولانی‌تر تولید گاز در سطوح یادشده، به جبران کاهش تولید گاز ناشی از نرخ پایین‌تر تولید گاز انجامیده است. بیشتر اطلاعات موجود در رابطه با اسانس پونهٔ کوهی به تحقیقات آزمایشگاهی ۲۴ ساعتی محدود است که در برخی از آن‌ها مقدار گاز تولیدی، به‌خصوص در دوزهای بالای ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس کاهش یافت (Lin *et al.*, 2011) که با نتایج تحقیق حاضر تقریباً همسو است. در برخی دیگر از تحقیقات، به‌واسطهٔ افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار در دوزهای پایین (۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) اسانس پونهٔ کوهی، تخمیر شکمبه‌ای تحریک شده است (Castillejos *et al.*, 2008)، اما در آزمایش حاضر تأثیرات تحریکی اسانس پونهٔ کوهی فقط در مقدار گاز تولیدی مشاهده شد. تأثیرات منفی اسانس‌های روغنی بر تخمیر شکمبه‌ای، به تأثیرات ضدمیکروبی ترکیبات مؤثرهٔ آن‌ها نسبت داده شده است (Benchaar *et al.*, 2008). با این حال، تأثیرات تحریک‌کنندهٔ آن‌ها بر

تخمیر شکمبه هنوز به‌درستی مشخص نشده است. یکی از عوامل تعیین‌کننده در این راستا، تأثیرات ممانعتی اسانس‌های روغنی بر رشد پروتوزوآها عنوان شده است (Newbold *et al.*, 1997) که با افزایش جمعیت میکروبی فعال به‌خصوص باکتری‌های سلولولیتیک موجب افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار و تولید پروتئین میکروبی می‌شود؛ البته در بسیاری از آزمایش‌ها این اثر به اثبات نرسیده است. با وجود این، بر اساس تحقیقات در سال‌های اخیر، مشخص شده است که برخی از ترکیبات متشکلهٔ اسانس‌های روغنی، به‌عنوان منبع کربن و انرژی، توسط باکتری‌های شکمبه تجزیه و استفاده می‌شوند (Malecky *et al.*, 2012; Malecky & Broudiscou, 2009; Malecky *et al.*, 2009)؛ شاید این موضوع توضیح‌دهندهٔ بخشی از تأثیرات تحریکی اسانس‌های روغنی بر فعالیت تخمیری شکمبه، از جمله افزایش تولید گاز در تحقیق حاضر باشد.

**اثر اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر فراسنجه‌های هضم و تخمیر شکمبه**

شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه نیز به‌صورت وابسته به دوز، تحت تأثیر اسانس روغنی پونهٔ کوهی قرار گرفتند (جدول ۲). در این زمینه، تولید گاز ۲۴ ساعت به‌موازات افزایش سطح اسانس، به‌طور خطی و درجهٔ دو تغییر کرد (P <۰/۰۵)، به‌طوری‌که مقدار آن در سطوح ۲۵۰ تا ۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس، افزایش نشان داد و در بالاترین سطح اسانس، در مقایسه با شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵). همچنین مقدار هضم حقیقی مادهٔ خشک و آلی به‌طور خطی و درجهٔ دوم تحت تأثیر افزودن اسانس پونهٔ کوهی قرار گرفتند (P<۰/۰۵). با وجود این، این دو فراسنجه تا سطح ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس بدون تغییر بودند و در سطوح بالاتر کاهش یافتند. با افزایش سطح اسانس، تودهٔ میکروبی به‌طور غیرخطی و درجهٔ دو تغییر کرد (P <۰/۰۵)؛ بیشترین مقدار آن در سطوح ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین آن در سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس پونهٔ کوهی مشاهده شد که تفاوت معناداری بین این دو گروه مشاهده شد (P <۰/۰۵). در اینجا ذکر این نکته ضروری است که با توجه به کافی‌نبودن سرعت سانتریفیوژ در جداسازی باکتری‌ها از فاز مایع، این پارامتر نمی‌تواند نمایندهٔ کل تودهٔ میکروبی باشد. فاکتور تفکیک از روند خطی و درجهٔ دو تبعیت کرد (P<۰/۰۵) که با تودهٔ میکروبی متفاوت بود. با افزایش سطح اسانس، غلظت کل اسیدهای چرب فرار نیز به‌طور خطی و درجهٔ دو تغییر کرد (P<۰/۰۵)، به‌طوری که غلظت آن در سطوح بالاتر از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مقایسه با بقیهٔ سطوح کاهش یافت (P<۰/۰۵). در این میان، پروفایل اسیدهای چرب فرار نیز تحت تأثیر اسانس روغنی پونهٔ کوهی قرار گرفت؛ به گونه‌ای که نسبت مولی استات به‌طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵)، اما نسبت‌های مولی پروپیونات و بوتیرات به‌طور خطی و غیرخطی تغییر کردند (P<۰/۰۱)، به‌طوری‌که در سطوح ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس، نسبت پروپیونات کاهش داشت و نسبت بوتیرات در مقایسه با سایر سطوح افزایش یافت (P<۰/۰۵). یک اثر خطی و درجهٔ دو نیز برای نسبت استات به پروپیونات مشاهده شد (P<۰/۰۵)؛ به شکلی که مقدار آن در بالاترین سطح اسانس در مقایسه با سایر سطوح افزایش یافت (P<۰/۰۵). با افزایش سطح اسانس، غلظت آمونیاک به‌صورت درجهٔ دو تغییر کرد (P<۰/۰۵) که بیشترین مقدار آن در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس مشاهده شد.

در مرحلهٔ دوم آزمایش، اثر ترکیبی (خطی و درجهٔ دو) از اسانس پونهٔ کوهی بر بیشتر شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه مشاهده شد. با وجود این، تغییرات مربوط به گاز تولیدی بعد از ۲۴ ساعت، مقدار هضم حقیقی مادهٔ خشک و آلی و کل غلظت اسیدهای چرب فرار به‌طور کامل بر هم منطبق نبود، به طوری که کل غلظت اسیدهای چرب فرار از سطح ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و بالاتر اسانس کاهش یافت، اما این کاهش برای مقدار هضم حقیقی مادهٔ خشک و آلی در سطح ۷۵۰ و برای تولید گاز فقط در سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس اتفاق افتاد. این نتایج به نوعی می‌تواند تأییدکنندهٔ فرضیهٔ قبلی بر اساس نتایج Malecky *et al.* (2012) مبنی بر دخالت مستقیم

برخی از ترکیبات اسانس در فرایند تخمیر از جمله تولید گاز باشد. همین موضوع می‌تواند توجیه‌گر عدم مطابقت بین فاکتور تفکیک و تودهٔ میکروبی باشد. این موضوع ارتباط بین فراسنجه‌های تخمیر را پیچیده‌تر می‌کند؛ بنابراین تفسیر این ارتباط‌ها باید بااحتیاط صورت گیرد. در این تحقیق در دوزهای بالای ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس، هم غلظت کل اسیدهای چرب فرار و هم هضم حقیقی مادهٔ آلی کاهش یافت. با این حال کاهش در غلظت کل اسیدهای چرب فرار به‌طور نسبی بارزتر از کاهش در هضم حقیقی مادهٔ آلی بود؛ بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که توزیع مادهٔ آلی هضم‌شده بین دو مسیر تخمیر (تولید اسیدهای چرب فرار) و تولید تودهٔ میکروبی، بیشتر به سمت مسیر دوم تغییر کرده است. این موضوع با توجه به تغییرات تودهٔ میکروبی منطقی به نظر می‌رسد. با این حال، با توجه به کاهش تودهٔ میکروبی در بالاترین سطح اسانس، افزایش فاکتور تفکیک در این سطح می‌تواند ناشی از کاهش تخمیر مواد آلی محلول در محیط کشت (کاهش تولید گاز) به وسیلهٔ میکروب‌ها، به دلیل تأثیرات منفی اسانس بر رشد و فعالیت میکروب‌ها باشد. مطابق با نتایج تحقیق حاضر، بیشتر داده‌های موجود در منابع، از تأثیرات منفی اسانس پونهٔ کوهی بر هضم و تخمیر شکمبه (غلظت اسیدهای چرب فرار) در دوزهای بالا (عموماً بیشتر از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) حاکی است (Castillejos *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2014).

جدول ۲. تأثیرات سطوح مختلف اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر فراسنجه‌های هضم و تخمیر شکمبه

| فراسنجه‌ها [1] | دوز اسانس روغنی پونهٔ کوهی (میلی‌گرم بر لیتر) | | | | SEM | P-value | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ۰ | ۲۵۰ | ۵۰۰ | ۷۵۰ | ۱۰۰۰ | | خطی | درجهٔ دو |
| تولید گاز ۲۴ ساعت | ۱۲۷ $^{b}$ | ۱۳۵/۳ $^{a}$ | ۱۳۱/۵ $^{a}$ | ۱۳۵ $^{a}$ | ۱۰۶/۳ $^{c}$ | ۱/۱۹ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ |
| مقدار هضم حقیقی مادهٔ خشک | ۸۲/۰ $^{a}$ | ۸۲/۵ $^{a}$ | ۸۲/۲ $^{a}$ | ۷۸/۴ $^{b}$ | ۷۴/۱ $^{c}$ | ۰/۶۷ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ |
| مقدار هضم حقیقی مادهٔ آلی | ۸۳/۱ $^{a}$ | ۸۲/۷ $^{a}$ | ۸۲/۶ $^{a}$ | ۷۹/۱ $^{b}$ | ۷۴/۹ $^{c}$ | ۰/۸۱ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۷ |
| تودهٔ میکروبی | ۱۷۷/۵ $^{ab}$ | ۱۷۴/۵ $^{ab}$ | ۱۹۱/۰ $^{a}$ | ۱۹۱/۳ $^{a}$ | ۱۶۱/۰ $^{b}$ | ۷/۰۴ | ۰/۴۸۰ | ۰/۰۳۲ |
| فاکتور تفکیک | ۳/۰۷ $^{b}$ | ۲/۸۸ $^{c}$ | ۲/۹۶ $^{c}$ | ۲/۷۶ $^{d}$ | ۳/۳۲ $^{a}$ | ۰/۰۳۰ | ۰/۰۰۴ | <۰/۰۰۱ |
| کل اسیدهای چرب فرار | ۸۴/۱ $^{a}$ | ۸۵/۳ $^{a}$ | ۷۶/۳ $^{ab}$ | ۶۷/۴ $^{b}$ | ۳۰/۴ $^{c}$ | ۴/۵۸ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۲ |
| استات | ۶۲/۴ $^{ab}$ | ۶۳/۳ $^{a}$ | ۶۳/۴ $^{a}$ | ۵۶/۸ $^{b}$ | ۵۷/۵ $^{ab}$ | ۱/۷۷ | ۰/۰۳۱ | ۰/۳۱۲ |
| پروپیونات | ۲۰/۸ $^{a}$ | ۲۰/۹ $^{a}$ | ۲۰/۵ $^{a}$ | ۱۶/۷ $^{b}$ | ۱۰/۷ $^{c}$ | ۰/۵۷ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ |
| بوتیرات | ۱۴/۸ $^{c}$ | ۱۴/۱ $^{c}$ | ۱۴/۱ $^{c}$ | ۲۳/۴ $^{b}$ | ۳۰/۲ $^{a}$ | ۱/۳۶ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۳ |
| استات/پروپیونات | ۳/۰۱ $^{b}$ | ۳/۰۴ $^{b}$ | ۳/۱۰ $^{b}$ | ۳/۴۰ $^{b}$ | ۵/۳۹ $^{a}$ | ۰/۱۹۵ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۴۰ |
| آمونیاک | ۹/۶ $^{c}$ | ۱۳/۸ $^{a}$ | ۱۱/۱ $^{bc}$ | ۱۲/۲ $^{ab}$ | ۱۲/۵ $^{ab}$ | ۰/۷۰ | ۰/۱۰۹ | ۰/۰۲۴ |

۱. حجم گاز تولیدی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون ($GP_{24}$، میلی‌لیتر بر ۵۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک)؛ مقدار هضم حقیقی مادهٔ خشک آزمایشگاهی (IVTDMD، درصد)؛ مقدار هضم حقیقی مادهٔ آلی آزمایشگاهی (IVTOMD، درصد)؛ تودهٔ میکروبی (MB، میلی‌گرم)؛ فاکتور تفکیک (PF، میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده بر میلی‌لیتر گاز تولیدی)؛ غلظت کل اسیدهای چرب فرار (TVFA، میلی‌مول بر لیتر)؛ نسبت مولی استات (مول بر ۱۰۰ مول)؛ نسبت مولی پروپیونات (مول بر ۱۰۰ مول)؛ نسبت مولی بوتیرات (مول بر ۱۰۰ مول)؛ آمونیاک (میلی‌مول بر لیتر). حروف غیرمشترک در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنادار است (P<۰/۰۵).

همچنین تغییر در الگوی اسیدهای چرب فرار، از جمله افزایش نسبت بوتیرات در مقابل کاهش نسبت پروپیونات و تا حدی استات و همچنین افزایش نسبت استات به پروپیونات در تحقیق حاضر نیز با داده‌های موجود در منابع در این رابطه همخوانی دارد (Busquet *et al.*, 2006; Cardozo *et al.*, 2004). افزایش نسبت بوتیرات توسط برخی از اسانس‌های روغنی به تغییر در ترکیب میکروبی شکمبه به نفع باکتری‌های تولیدکنندهٔ بوتیرات از جمله *بوتیریویبریو فیبروسلونس*[1] یا کاهش باکتری‌های مصرف‌کنندهٔ بوتیرات در شکمبه (Patra & Yu, 2012) نسبت داده شده است. تحقیقات قبلی از تأثیرات متفاوت اسانس پونهٔ کوهی بر غلظت آمونیاک حاکی است. در برخی موارد تأثیرات کاهشی (Busquet *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011) و در برخی موارد تأثیرات افزایشی (Tekippe *et al.*, 2011) گزارش شده

1. *Butyrivibrio fibrisolvens*

است. عوامل افزایش غلظت آمونیاک در تحقیق حاضر که در سطح پایین و سطوح بالای اسانس مشاهده شد، احتمالاً متفاوت هستند. به‌طور معمول غلظت شکمبه‌ای آمونیاک (در شرایط آزمایشگاهی) در هر زمان برآیندی از تأثیرات افزایندهٔ ناشی از افزایش تجزیهٔ پروتئین و تأثیرات کاهندهٔ ناشی از مصرف آمونیاک توسط برخی باکتری‌ها به‌خصوص باکتری‌های سلولولیتیک است (Nolan & Dobos, 2005)؛ بنابراین افزایش غلظت آمونیاک در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس، ناشی از افزایش تجزیهٔ پروتئین یا افزایش فعالیت دآمیناسیون اسیدهای آمینه است و افزایش غلظت آن در سطوح بالای اسانس احتمالاً به کاهش فعالیت باکتری‌های عمدهٔ مصرف‌کنندهٔ آن مربوط می‌شود.

**اثر اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر تولید متان**

در مرحلهٔ سوم آزمایش، تمامی مؤلفه‌های اندازه‌گیری‌شده شامل کل گاز تولیدی (TG)، گاز دی‌اکسید کربن ($CO_2$)، متان ($CH_4$) و درصد متان ($\%CH_4$)، همگی به‌طور غیرخطی (خطی و درجهٔ دو) تحت تأثیر اسانس روغنی پونهٔ کوهی قرار گرفتند ($P<0/01$). در این میان مقدار TG و $CO_2$، بعد از یک افزایش عددی تا سطح ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، در سطوح بالاتر کاهش یافتند که این کاهش در سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور معناداری کمتر از شاهد بود ($P<0/05$)؛ اما مقدار $CH_4$ و $\%CH_4$ باوجود افزایش کل گاز تولیدی در سطوح تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، ثابت ماند و در سطوح بالاتر کاهش یافت.

جدول ۳. اثر اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر مقدار و درصد متان تولیدی

| مؤلفه | دوز اسانس پونهٔ کوهی (میلی‌گرم بر لیتر) | | | | | SEM | P-value | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | صفر | ۲۵۰ | ۵۰۰ | ۷۵۰ | ۱۰۰۰ | | خطی | درجهٔ دو |
| TG | ۲۱/۳ ab | ۲۲/۳ a | ۲۲/۳ a | ۱۸/۳ b | ۱۲/۲ c | ۰/۸۹ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۱ |
| $CO_2$ | ۱۶/۸ ab | ۱۸/۰ a | ۱۸/۰ a | ۱۵/۳ b | ۱۱/۷ c | ۰/۷۲ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۳ |
| $CH_4$ | ۴/۵ a | ۴/۳ a | ۴/۳ a | ۳/۰ b | ۰/۵ c | ۰/۲۸ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ |
| $\%CH_4$ | ۲۱/۱۸ | ۱۹/۰۹ | ۱۹/۱۲ | ۱۶/۳۵ | ۳/۹۲ | ۱/۵۴ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۵ |

TG. حجم کل گاز تولیدی (میلی‌لیتر بر ۱۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک)؛ $CO_2$. حجم گاز دی‌اکسید کربن (میلی‌لیتر بر ۱۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک)؛ $CH_4$. حجم متان تولیدی (میلی‌لیتر بر ۱۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک)؛ $\%CH_4$. درصد حجم متان از حجم کل گاز تولیدی.
حروف غیرمشترک در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنادار است ($P<0/05$).

شایان ذکر است که در این آزمایش متان اندازه‌گیری‌شده بیانگر مقدار دقیق آن نیست، زیرا در گاز باقیمانده بعد از جذب دی‌اکسید کربن، عموماً گازهای دیگری همچون نیتروژن، هیدروژن و همین‌طور سولفید هیدروژن و مقادیر بسیار ناچیزی اکسیژن هم وجود دارد. با وجود این مقادیر آن‌ها در مقایسه با متان بسیار کمتر است و بنابراین گاز باقیمانده می‌تواند شاخص تقریبی از وضعیت تولید متان باشد. در این آزمایش باوجود افزایش ۷ درصدی در مقدار گاز دی‌اکسیدکربن در سطوح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس، مقدار گاز متان در همین سطوح ۴/۵ درصد کاهش یافت که به کاهش درصد گاز متان انجامید. در مجموع با توجه به روند کاهشی مقدار و درصد متان، با وجود افزایش عددی در مقدار دی‌اکسیدکربن در سطوح پایین و متوسط و با علم به اینکه دی‌اکسیدکربن از پیش‌سازهای متان محسوب می‌گردد، این نتایج می‌تواند گویای اثر مستقیم و کاهندهٔ اسانس پونهٔ کوهی بر فعالیت متانوژن‌ها باشد. هرچند بخشی از کاهش شایان‌توجه مقدار متان تولیدی در سطوح بالاتر اسانس می‌تواند به کاهش پیش‌ساز آن مربوط باشد، اما کاهش چشمگیر درصد متان در این سطوح گویای این واقعیت است که تأثیر محدودیت دی‌اکسیدکربن در این کاهش بسیار ناچیز است و این کاهش در تولید متان، نه نتیجهٔ کاهش پیش‌ساز آن ($CO_2$)، بلکه به احتمال زیاد نتیجهٔ کاهش جمعیت و فعالیت باکتری‌های متانوژن است. ذکر این نکته نیز حائز اهمیت است که مهار تولید متان ممکن است به افزایش گاز هیدروژن بینجامد و این افزایش در هیدروژن تولیدی می‌تواند موجب تقویت مسیرهای دیگر مصرف‌کنندهٔ هیدروژن از جمله

مسیر تولید بوتیرات گردد و این شاید یکی از دلایل افزایش بوتیرات در تخمیر شکمبه باشد. تحقیقات قبلی حاکی از تأثیرات کاهندهٔ درخورتوجه اسانس پونهٔ کوهی بر متان تولیدی در شکمبه است (Hristov *et al.*, 2013; Jahani-Azizabadi *et al.*, 2011). بر اساس مطالعات انجام‌گرفته، بخشی از کاهش تولید متان شکمبه‌ای می‌تواند ناشی از کاهش دسترسی پیش‌سازهای آن یا کاهش جمعیت پروتوزوآیی باشد (Jouany & Morgavi, 2007; McAllister & Newbold, 2008). با وجود این، در رابطه با اسانس‌های روغنی بخش عمدهٔ کاهش تولید متان به تأثیرات منفی و مستقیم این ترکیبات بر جمعیت و فعالیت متانوژن‌ها نسبت داده شده است (Calsamiglia *et al.*, 2007).

**اثر اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر اسیدوز شکمبه‌ای القاشده**

استفاده از اسانس روغنی پونهٔ کوهی باوجود ایجاد تغییر در مقدار گاز تولیدی، در هیچ‌کدام از سطوح مورداستفاده در مقایسه با تیمار اسیدوز کنترل‌نشده در کاهش pH و کنترل اسیدوز شکمبه‌ای تأثیری نداشت (P>۰/۰۵). با این حال، استفاده از آنتی‌بیوتیک ویرجینیامایسین در محیط کشت میکروبی موجب افزایش معنادار pH در مقایسه با تیمار اسیدوز کنترل‌نشده (P <۰/۰۵) شد (جدول ۴). نبود تغییر در pH شکمبه‌ای باوجود کاهش تولید گاز در بالاترین سطح اسانس می‌تواند گویای این واقعیت باشد که استفاده از اسانس پونهٔ کوهی به‌خصوص در بالاترین دوز، علیرغم مهار گسترهٔ وسیعی از میکروارگانیسم‌های دخیل در تخمیر و تولید گاز، تأثیری بر باکتری‌های دخیل در اسیدوز شکمبه‌ای، از جمله انواع تولیدکنندهٔ اسیدلاکتیک همچون *استرپتوکوکوس بویس*[1] و برخی از *لاکتوباسیلوسها*[2] (Nagaraja, 2002) نداشته است. با این حال، مهار باکتری‌های مصرف‌کنندهٔ اسید لاکتیک همچون *مکاسفرا السدنی*[3] توسط اسانس پونهٔ کوهی نیز می‌تواند در پایین‌ماندن pH در محیط کشت‌های حاوی اسانس مؤثر باشد (Patra & Yu, 2014).

جدول ۴. اثر اسانس روغنی پونهٔ کوهی بر اسیدوز شکمبه‌ای القاشده

| تیمار[1] | pH | گاز تولیدی |
|---|---|---|
| شاهد | ۶/۵۸ a | ۵۰/۰ bc |
| اسیدوز کنترل‌نشده | ۶/۰۰ c | ۴۸/۳ c |
| شاهد مثبت | ۶/۳۶ b | ۵۳/۰ abc |
| اسانس پونهٔ کوهی (صفر) | ۶/۰۰ c | ۵۲/۷ abc |
| اسانس پونهٔ کوهی (۲۵۰) | ۵/۹۹ c | ۵۷/۰ a |
| اسانس پونهٔ کوهی (۵۰۰) | ۶/۰۲ c | ۵۳/۲ ab |
| اسانس پونهٔ کوهی (۷۵۰) | ۶/۰۳ c | ۵۵/۷ abc |
| اسانس پونهٔ کوهی (۱۰۰۰) | ۶/۰۰ c | ۳۶/۰ d |
| SEM | ۰/۰۱۲ | ۱/۸ |
| P-value | P <۰/۰۰۱ | P <۰/۰۰۱ |

۱. شاهد: تیمار حاوی کاه جو، اسیدوز کنترل نشده: تیمار حاوی کاه جو و دی-گلوکز، شاهد مثبت: تیمار حاوی کاه جو، دی-گلوکز و ویرجینیامایسین، اسانس پونهٔ کوهی (صفر تا۱۰۰۰): تیمارهای حاوی سطوح مختلف اسانس روغنی پونهٔ کوهی (میلی‌گرم بر لیتر).

ـ حروف غیرمشترک در هر ردیف بیانگر وجود تفاوت معنادار است (P<۰/۰۵).

**نتیجه‌گیری کلی**

در مجموع نتایج این تحقیق استفاده از اسانس روغنی پونهٔ کوهی تا سطوح ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر هضم و تخمیر شکمبه‌ای تأثیر منفی نداشت و حتی تا حدودی موجب بهبود برخی از فراسنجه‌های تخمیر همچون افزایش تولید گاز و تودهٔ میکروبی و کاهش تولید گاز متان شد. با این حال، کاهش قابل‌توجه تولید متان در سطوح بالاتر با کاهش دیگر شاخص‌های هضمی و تخمیر همراه بود که نشان‌دهندهٔ اثر منفی عمومی این اسانس بر بسیاری از میکروارگانیسم‌های شکمبه است. در همین حال، استفاده از این اسانس در تمامی سطوح تأثیری بر pH شکمبه‌ای نداشت که گویای مقاومت زیاد باکتری‌های عامل ایجاد اسیدوز شکمبه‌ای در مقابل این اسانس است. در نتیجه، با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان اذعان داشت که باوجود برخی تأثیرات مثبت اسانس پونهٔ کوهی بر تخمیر شکمبه در دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، امکان استفاده از آن به‌عنوان یک افزودنی با

1. *Streptococcus bovis*
2. *Lactobacillus spp.*
3. *Megasphaera elsdenii*

توجه به هزینه‌های تهیهٔ اسانس و مشکلات مربوط به استفاده در جیرهٔ دام‌ها به لحاظ اقتصادی منطقی به نظر نمی‌رسد. با وجود این مطالعهٔ تأثیرات آن به‌صورت ترکیبی با سایر اسانس‌های روغنی بر تخمیر شکمبه یا سایر جنبه‌های تولیدی دام‌ها می‌تواند ارزش آن را به‌عنوان یک افزودنی در تغذیهٔ دام‌ها روشن‌تر کند.

## REFERENCES


1. AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. (17th ed.). VA, USA: Arlington.
2. Baratta, M. T., Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (1998). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 618-627.
3. Beauchemin, K. A. & McGinn, S. M. (2006). Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science*, 84(6), 1489-1496.
4. Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A. & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 209-228.
5. Blummel, M., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (1997a). In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 77, 24-34.
6. Blummel, M., Steingab, H. & Becker, K. (1997b). The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and N-15 incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77(6), 911-921.
7. Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. J. & López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4), 78-93.
8. Broderick, G. A. & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63, 64-75.
9. Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2006). Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 761-771.
10. Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2005). Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*, 124(3-4), 597-613.
11. 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(6), 2580-2595.
12. Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2005). Screening for the effects of natural plant extracts at two pH levels on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate beef cattle diet. *Journal of Dairy Science*, 88, 49-50.
13. Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 82(11), 3230-3236.
14. Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martin-Tereso, J. & Ter Wijlen, H. (2008). In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 259-270.
15. 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*(7), 2649-2658.
16. Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Losa, R. (2005). Effects of adaptation time of a specific blend of essential oils on rumen nitrogen metabolism and fermentation profile in sheep. *Journal of Dairy Science, 88*, 315-315.
17. Chaves, A. V., Baah, J., Wang, Y., McAllister, T. A. & Benchaar, C. h. (2012). Effects ofcinnamon leaf, oregano and sweet orange essential oils on fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 906-915.
18. Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
19. Fievez, V., Babayemi, O. J. & 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*, 124, 197-210.
20. Firkins, J. L., Yu, Z. & Morrison, M. (2007). Ruminal nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. *Journal of Dairy Science*, 90(Suppl 1), E1-16.
21. France, J., Dhanoa, M. S., Theodorou, M. K., Lister, S. J., Davies, D. R. & Isac, D. (1993). A Model to Interpret Gas Accumulation Profiles Associated with Invitro Degradation of Ruminant Feeds. *Journal of Theoretical Biology*, 163(1), 99-111.

22. Hristov, A. N., Lee, C., Cassidy, T., Heyler, K., Tekippe, J. A., Varga, G. A., Corl, B. & Brandt, R. C. (2013). Effect of Origanum vulgare L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 1189-1202.
23. Hutton, P.G., Nagaraja, T.G., White, C.L. & Vercoe, P.E. (2010). Screening Plants for the Antimicrobial Control of Lactic Acidosis in Ruminant Livestock. In P. E. Vercoe, H. P. S. Makkar & A. C. Schlink (Eds.), *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies* (pp. 159-189). Dordrecht Heidelberg/ London/ New York: Springer.
24. Jahani-Azizabadi, H., Mesgaran, M. D., Vakili, A. R., Rezayazdi, K. & Hashemi, M. (2011). Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high forage diet using in vitro batch culture. *African Journal of Microbiological Research*, 5, 4812-4819.
25. Jouany, J. P. & Morgavi, D. R. (2007). Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*, 1(10), 1443-1466.
26. Kumar, R., Kamra, D. & Agarwal, N. (2009). Effect of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Nutrition and Feed Ttechnology*, *9*, 237-243.
27. Lin, B., Ji, M., Liang, Q., Lu, Y. & Liu, J. (2011). Effect of cinnamon oil and oregano oil and their major components on rumen fermentation /i in vitro. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 31(2), 279-282, 287.
28. López, S., Makkar, H. P. S. & Soliva, C. R. (2010). Screening plants and plant products for methane inhibitors. In P. E. Vercoe, H. P. S. Makkar & A. C. Schlink (Eds.), *In vitro Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies* (pp. 191–231). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
29. Makkar, H. P. S., Blümmel, M. & Becker, K. (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *British Journal of Nutrition*, 73, 897-913.
30. Malecky, M., Albarello, H. & Broudiscou, L. P. (2012). Degradation of terpenes and terpenoids from Mediterranean rangelands by mixed rumen bacteria in vitro. *Animal*, 6, 612-616.
31. Malecky, M. & Broudiscou, L. P. (2009). Disappearance of nine monoterpenes exposed in vitro to the rumen microflora of dairy goats: Effects of inoculum source, redox potential, and vancomycin *Journal of Animal Science*, 87, 1366-1373.
32. Malecky, M., Broudiscou, L. P. & Schmidely, P. (2009). Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. *Animal Feed Science and Technology*, 154(1/2), 24-35.
33. Malecky, M., Fedele, V. & Broudiscou, L. P. (2008). In vitro degradation by mixed rumen bacteria of 17 mono- and sesquiterpenes typical of winter and spring diets of goats on Basilitica rangelands (southern Italy). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 531-536.
34. McAllister, T.A. & Newbold, C.J. (2008). Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(1-2), 7-13.
35. Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steinglass, H., Fritz, D. & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 93, 217-222.
36. 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 Reaseach and Development*, 28, 7-55.
37. Meyer, N. F., Erickson, G. E., Klopfenstein, T. J., Greenquist, M. A., Luebbe, M. K., Williams, P. & Engstrom, M.A. (2009). Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *Journal of Animal Science*, 87(7), 2346-2354.
38. Nagaraja, T. G. (2002). Ruminal microorganisms and digestive disorders in cattle. In: S. A. Martin (Ed.), *Gastrointestinal Microbiology in Animals* (pp. 41-60). Kerala, India: Research Signpost.
39. Newbold, C. J., ElHassan, S. M., Wang, J., Ortega, M. E. & Wallace, R. J. (1997). Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *British Journal of Nutrition*, 78(2), 237-249.
40. Nolan, J. V. & Dobos, R. C. (2005). Nitrogen Transactions in Ruminants. In J. Dijkstra, J. M. Forbes & J. France (Eds.), *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism* (2 ed., pp. 177-206). Walingford, UK: CABI Publishing.
41. Ottenstein, D. M. & Bartley, D. A. (1971). Separation of free acids C2-C5 in diluted aqueous solution column technology. *Journal of Chromatographic Science*, 9, 673-681.

42. Patra, A. K. & 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(12), 4271-4280.
43. Patra, A. K. & Yu, Z. (2014). Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 897-905.
44. Patra, A. K. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, *6*, 416- 428.
45. Roy, D., Tomar, S. K., Sirohi, S. K., Kumar, V. & Kumar, M. (2014). Efficacy of different essential oils in modulating rumen fermentation in vitro using buffalo rumen liquor. *Veterinary World*, 7(4), 213-218.
46. SAS. (2002). *Statistical Analytical System Users Guide*. Cary, NC, USA: SAS Institute.
47. Talebzadeh, R., Alipour, D., Saharkhiz, M. J. & Malecky, M. (2013). In vitro evaluation of the effects of Ajowan (*Carum copticum* L.) essential oils on the parameters of ruminal fermentation. *Journal of Ruminant Research*, 1, 17-30.
48. Tekippe, J. A., Hristov, A. N., Heyler, K. S., Cassidy, T. W., Zheljazkov, V. D., Ferreira, J. F., Karnati, S. K. & Varga, G. A. (2011). Rumen fermentation and production effects of Origanum vulgare L. leaves in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 5065-5079.
49. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.

Iranian Journal of Animal Science, Vol. 46, No. 3, Autumn 2015

# In vitro study the effects of different levels of oregano (*Origanum vulgare*) essential oils on ruminal fermentation parameters, methane production and rumen induced acidosis

**Shahin Yadeghari[1], Mostafa Malecky[2*], Pouya Zamani[3] and Mahdi Dehgham-Banadaky[4]**
1, 2, 3. Former M.Sc. Student, Assistant Professor, Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran
4. Associate Professor,Department of Animal Science, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Nov. 22, 2014 - Accepted: Aug. 12, 2015)

## ABSTRACT

The aim of the current study was to assess effects of different levels of *Origanum vulgare* (0, 250, 500, 750 and 1000 mg/L) on kinetics of gas production, some ruminal digestion and fermentation parameters, methane production and also to determine its potential in controlling rumen acidosis using *in vitro* method in four separate phases. In the first phase, the asymptote of gas production (A) and gas production rate (b) were changed nonlinearly and lag phase (L) increased linearly with increasing doses of oregano essential oils (P<0.0). The highest A and b and the lowest L were observed at 250 mg/L of the essential oil. In the second phase, the *in vitro* true dry matter (IVTDMD) and organic matter (IVTOMD) degradability, and total volatile fatty acids (TVFA) concentration decreased at doses higher than 500 mg/L. However, the gas produced after 24 h of incubation ($GP_{24}$) and microbial biomass (MB) were increased at doses up to 750 mg/L. The molar proportion of acetate and propionate increased and that of butyrate decreased at doses higher than 500 mg/L. Using oregano essential oil resulted also in a nonlinear decrease in concentration and percentage of produced methane, but had no effect at any of the used doses in controlling rumen acidosis.

**Keywords:** essential oil, gas production, methanogenesis, rumen acidosis.

* Corresponding author E-mail: malecky@agroparistech.fr, mmalecky@basu.ac.ir Tel: +98 8134424090