Vol 26, No. 3, Autumn 2024

University of Tehran Press

Journal of Animal Production

Online ISSN: 2382-994X

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

The effect of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation profile and rumen microbial population under *in vitro* and *in vivo* conditions

Behzad Khorrami[1]✉ | Seyed Alireza Vakili[2] | Mohsen Danesh Mesgaran[3]

1. Corresponding Author, Department of Animal and Poultry Science, Faculty of Agricultural Technology, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Pakdasht, Iran. E-mail: bkhorrami@ut.ac.ir
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: sarvakili@um.ac.ir
3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: danesh@um.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 25 April 2024
Received in revised form
9 June 2024
Accepted 13 August 2024
Published online 30 September 2024

Keywords:
Cinnamon oil
Feedlot calves
In vitro gas production
Rumen microbial fermentation
Thyme oil

ABSTRACT

Introduction: Today, the use of antimicrobial agents such as antibiotics in livestock diets is facing reduced social acceptance because of the appearance of residues in milk and meat, and therefore, ruminant nutritionists are seeking for appropriate alternatives for these feed additives. The study of essential oils (EOs) as natural feed additives capable of improving rumen microbial fermentation has taken into consideration by nutritionists. Among the EOs, thyme (THY) and cinnamon (CIN) oil have attracted significant attention due to their antimicrobial activity against ruminal microorganisms. Therefore, more research is required to understand their impacts on rumen microbial fermentation in ruminants. Moreover, to the best of our knowledge, few studies has synchronously compared the influences of THY and CIN on rumen fermentation and microorganisms. This study was conducted to evaluate the effect of THY and CIN on performance, and rumen microbial fermentation under *in vitro* and *in vivo* conditions.

Materials and methods: In the *in vitro* experiment, different concentrations (0, 125, 250, 500, and 1000 mg/l) of THY and CIN were incubated for 24-h in batch culture. In the *in vivo* study 18 growing Holstein calves were used in a completely randomized design to examine effects of supplementing a basal diet (CON) with thyme oil (THY, 5 g/d/calf) or cinnamon oil (CIN, 5 g/d/calf) on performance and rumen microbial fermentation. Calves were fed *ad libitum* diets consisting of 15% forage and 85% concentrate for 80 d.

Results and discussion: The high concentration of THY and CIN (1000 mg/l) inhibited rumen microbial fermentation thereby decreasing total gas production and DM disappearance at 24 of incubation, and total VFA concentration. Cinnamon oil at 1000 mg/l increased final pH of batch culture ($P<0.05$). The lower concentration of THY and CIN (125 and 250 mg/l) decreased the acetate to propionate ratio ($P<0.05$), without reducing VFA concentration. Supplementation of THY or CIN did not affect DMI and ADG. There were also no effects of EOs on ruminal pH, rumen concentrations of ammonia nitrogen and total VFA; whereas molar proportion of acetate and ratio of acetate to propionate decreased ($P<0.05$), and the molar proportion of propionate increased ($P<0.05$). Rumen molar proportion of butyrate was significantly increased ($P<0.05$) by adding CIN. The population of protozoa and methanogens bacteria decreased in the rumen of calves receiving EOs ($P<0.05$). Ruminal population of *Fibrobacter succinogenes* was not affected by treatments, but populations of *Ruminococcus albus* and *flavefaciens* decreased by THY and CIN ($P<0.05$).

Conclusion: Based on the results of the present study, although dietary addition of THY and CIN did not have a significant effect on the performance of feedlot calves, but it improved the rumen fermentation properties, which may be considered as potential alternatives for antibiotics in beef production systems.

Cite this article: Khorrami. B., Vakili. S. A.,& Danesh Mesgaran, M. (2024). The effect of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation profile and rumen microbial population under *in vitro* and in vivo conditions. *Journal of Animal Production*, 26 (3), 263-277. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.375614.623792

© The Author(s).
Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.375614.623792

دوره بیست و ششم، شماره سوم، پاییز ۱۴۰۳

انتشارات دانشگاه تهران

تولیدات دامی

شاپا الکترونیکی: ۲۳۸۲-۹۹۴x

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

ارزیابی تأثیر اسانس آویشن و دارچین بر عملکرد، الگوی تخمیر و جمعیت میکروبی شکمبه در شرایط آزمایشگاهی و حیوان زنده

بهزاد خرمی[۱]✉ | سید علیرضا وکیلی[۲] | محسن دانش مسگران[۳]

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم دام و طیور، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: bkhorrami@ut.ac.ir

۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: sarvakili@um.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: danesh@um.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۷/۰۹

کلیدواژه‌ها:

اسانس آویشن

اسانس دارچین

آزمون تولید گاز

تخمیر میکروبی شکمبه

گوساله پرواری

چکیده

در این مطالعه اثرات اسانس آویشن و دارچین بر تخمیر میکروبی شکمبه موردارزیابی قرار گرفت. در آزمایش برون‌تنی، غلظت‌های صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس آویشن و دارچین به‌مدت ۲۴ ساعت در یک محیط کشت بسته مورد انکوباسیون قرار گرفتند. در آزمایش حیوانی، ۱۸ رأس گوساله هلشتاین در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار شاهد (جیره پایه)، آویشن و دارچین (به‌ترتیب جیره پایه+ ۵ گرم اسانس آویشن و دارچین به‌ازای هر رأس گوساله در روز) استفاده شد. غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس‌ها، کل گاز تولیدی، ناپدیدشدن ماده خشک و غلظت اسیدهای چرب فرّار کل را کاهش داد (P<۰/۰۵). غلظت‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، نسبت استات به پروپیونات را کاهش داد (P<۰/۰۵). اسانس‌های گیاهی تأثیری بر ماده خشک مصرفی، افزایش وزن روزانه، pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرّار کل شکمبه گوساله‌ها نداشتند؛ درحالی‌که نسبت مولی استات و پروپیونات را به‌ترتیب کاهش و افزایش دادند (P<۰/۰۵). غلظت بوتیرات شکمبه با افزودن اسانس دارچین افزایش یافت (P<۰/۰۵). جمعیت پروتوزوآ و باکتری‌های متانوژنز شکمبه گوساله‌های دریافت‌کننده اسانس کاهش یافت (P<۰/۰۵). جمعیت باکتری‌های *فیبروباکتر سوکسینوژنز* تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت، اما جمعیت باکتری‌های *رومینوکوکوس* آلبوس و *فلاوفسینس* کاهش یافت (P<۰/۰۵). براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، اگرچه افزودن اسانس آویشن و دارچین به جیره بر عمکرد گوساله‌های پرواری تأثیر معنی‌داری نداشت، اما خصوصیات تخمیری شکمبه را بهبود بخشید که ممکن است بتوان از آن‌ها به‌عنوان جایگزین‌های بالقوه آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره‌های پرواری استفاده نمود.

استناد: خرمی، بهزاد؛ وکیلی، سید علیرضا و دانش مسگران، محسن (۱۴۰۳). ارزیابی تأثیر اسانس آویشن و دارچین بر عملکرد، الگوی تخمیر و جمعیت میکروبی شکمبه در شرایط آزمایشگاهی و حیوان زنده. *نشریه تولیدات دامی*، ۲۶ (۳)، ۲۶۳-۲۷۷. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.375614.623792

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

CC BY NC

۱. مقدمه

در دهه اخیر، استفاده از اسانس‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین شونده‌های عوامل ضدمیکروبی رایج مورداستفاده در سیستم‌های تولیدی دام توجه متخصصین تغذیه دام را به خود معطوف نموده است. این علاقه به‌ویژه از زمان ممنوعیت استفاده از این ترکیبات در کشورهای اتحادیه اروپا و هم‌چنین افزایش فشار از سوی متصدیان بخش سلامت عمومی جامعه برای کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی در صنعت دام افزایش قابل‌توجهی داشته است. از این‌رو، دانشمندان و متخصصین صنعت خوراک دام به شکل فعال در جستجوی روش‌های جایگزین مناسبی مانند استفاده از اسانس‌های گیاهی در تغذیه نشخوارکنندگان می‌باشند (Benchaar, 2021). اسانس‌های گیاهی ترکیبات ثانویه گیاهی می‌باشند که الکل، استر، یا مشتقات آلدئیدی ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها می‌باشند (Calsamiglia *et al*., 2007). شواهد به‌دست‌آمده از خواص ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات فعالشان، باعث شده است تعدادی از پژوهش‌گران توانایی این ترکیبات را برای تغییر شرایط تخمیر میکروبی شکمبه و بهبود بازده تولید در نشخوارکنندگان موردآزمایش قرار دهند. از نقطه نظر تغذیه‌ای (یعنی سوخت‌وساز انرژی و پروتئین) اسانس‌های گیاهی زمانی مفید واقع خواهند شد که موجب کاهش تجزیه پروتئین (یعنی کاهش تولید آمونیاک)، افزایش یا عدم تغییر غلظت اسیدهای چرب فرّار و تغییر الگوی تولید اسیدهای چرب فرّار به سمت تولید پروپیونات بیش‌تر و استات کم‌تر شوند (Benchaar, 2021).

با توجه به این‌که دامنه تنوع اسانس‌های گیاهی و ترکیبات مؤثر آن‌ها بسیار گسترده است و بسیاری از آن‌ها هنوز موردپژوهش قرار نگرفته‌اند، اثرات و طرز عمل آن‌ها در شکمبه تا حدودی ناشناخته می‌باشد. بنابراین، پژوهش‌های بیش‌تری به‌منظور مشخص‌شدن نحوه عمل اسانس‌های گیاهی و غلظت مؤثر آن‌ها جهت اصلاح الگوی تخمیر شکمبه موردنیاز است. در میان اسانس‌های گیاهی، اسانس آویشن و دارچین با توجه به توانایی بالقوه فعالیت‌های ضدمیکروبی در شکمبه بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Calsamiglia *et al*., 2007). نتایج مطالعات آزمایشگاهی (Castillejos *et al*., 2006) و مطالعات انجام‌شده بر روی گاوهای گوشتی (Yang *et al*., 2010b) و شیری (Benchaar, 2021) که اثرات اسانس آویشن و دارچین و یا ترکیبات عمده آن‌ها (به‌ترتیب، تیمول و سینمالدئید) را موردبررسی قرار داده‌اند بسیار ناسازگار می‌باشند و پژوهش‌های بیش‌تری موردنیاز است تا اثرات آن‌ها را بر تخمیر میکروبی شکمبه و سوخت‌وساز در نشخوارکنندگان تعیین نمایند. بنابراین، این پژوهش به‌منظور بررسی اثرات اسانس آویشن و دارچین بر عملکرد، فراسنجه‌های تخمیری و جمعیت میکروبی شکمبه گوساله‌های پرواری انجام گرفت.

۲. پیشینه پژوهش

به‌طور کلی سازوکار اصلی اسانس‌های گیاهی به‌عنوان متعادل‌کننده شرایط تخمیر در شکمبه مربوط به اثرات ضدمیکروبی ترکیبات فعال آن‌ها است. ترکیبات اصلی اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*) تیمول و کارواکرول می‌باشد (Calsamiglia *et al*., 2007). در همین راستا، گروهی از پژوهش‌گران نشان دادند که فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن در مایع شکمبه تا حد زیادی مربوط به ترکیب اصلی آن یعنی تیمول می‌باشد (Macheboeuf *et al*., 2008). در پژوهشی دیگر در شرایط تخمیری کشت بسته، اسانس آویشن غلظت اسیدهای چرب فرّار کل را افزایش داد که به لحاظ انرژی برای نشخوارکنندگان مفید می‌باشد. در همین آزمایش، دُزهای ۵۰۰ یا ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تیمول غلظت اسیدهای چرب شاخه‌دار و آمونیاک را کاهش داد که می‌تواند نشانه‌ای از مهار فرایند آمین‌زدایی باشد. افزودن اسانس آویشن به جیره تا ۸ میلی‌لیتر در روز، اثری بر ماده خشک مصرفی، غلظت کل و الگوی اسیدهای چرب فرّار شکمبه گاوهای پرواری نژاد نلور نداشت (Castro Filho *et al*., 2021). در آزمایشی مشابه، افزودن مخلوط اسانس‌های نعناع فلفلی،

آویشن و رزماری به جیره برههای پرواری میانگین افزایش وزن روزانه را افزایش داد، هرچند میزان مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک تحت تأثیر قرار نگرفت (رحمتیزاده و همکاران، ۱۴۰۱). در پژوهشی که بهتازگی روی گاوهای شیری انجام شد، استفاده از اسانس آویشن و یا تیمول هیچیک از صفات مربوط به عملکرد، فراسنجههای تخمیری شکمبه، جمعیت پروتوزآ و سوختوساز نیتروژن را تحت تأثیر قرار نداد (Benchaar, 2021). اثرات اسانس آویشن و تیمول بر سوختوساز پروتئین در بین مطالعات مختلف بسیار متغیر میباشد (Castro Filho *et al.*, 2021; Benchaar, 2021). پاسخهای ناسازگار سوختوساز شکمبه به اسانس آویشن بیانگر این است که پژوهشهای بیشتری موردنیاز است تا توانایی بالقوه اسانس آویشن را بهعنوان متعادلکننده شرایط تخمیر در شکمبه موردارزیابی قرار دهند.

ترکیبات فعال اصلی موجود در اسانس دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) شامل سینمالدئید و یوگنول میباشد (Calsamiglia *et al.*, 2007). استفاده از ۲۵۰ میلیگرم اسانس دارچین در محیط کشت آزمایشگاهی تولید متان و پروپیونات را کاهش داد (Chaves *et al.*, 2008b). در پژوهشی مشابه، اسانس دارچین مقدار اسیدهای چرب فرّار، پروتوزوآ، pH و تولید متان را در شکمبه مصنوعی و محیط کشت مداوم دو طرفه کاهش داد (Fraser *et al.*, 2007). برخی مطالعات افزایش (Yang *et al.*, 2010b) و یا کاهش (Cardozo *et al.*, 2006) مصرف خوراک را بهترتیب در گوسالههای پرواری و تلیسههای گوشتی بهواسطه افزودن اسانسهای گیاهی گزارش کردهاند. در همین راستا، مکملسازی جیره گاوهای پرواری با سینمالدئید تا ۱۶۰۰ میلیگرم در روز تأثیری بر افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک نداشت (Yang *et al.*, 2010b). نتایج یک مطالعه فراتحلیل بر روی ۳۰ آزمایش نشان داد که مکملسازی جیره با اسانسهای گیاهی میزان مصرف خوراک، میانگین افزایش وزن روزانه و بازده خوراک را در گاوهای پرواری افزایش میدهد (Orzuna-Orzuna *et al.*, 2022). استفاده از سینمالدئید در دُزهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلیگرم در روز بهازای هر رأس تلیسه، قابلیت هضم را کاهش و تعداد پروتوزوآ را افزایش داد (Yang *et al.*, 2010a). فعالیت ضدمیکروبی سینمالدئید احتمالاً مربوط به واکنشپذیری گروه کربونیل آن باشد، اما سازوکار عمل دقیق آن مشخص نیست (Helander *et al.*, 1998). اثرات ضدپروتوزوآیی اسانسهای گیاهی توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Fandino *et al.*, 2008; Anassori *et al.*, 2011). در پژوهشی مشابه روی گوسفند، افزودن اسانسهای گیاهی به جیره، جمعیت باکتریهای متانوژنز، *فیبروباکتر سوکسینوژنز*[1] و *بوتیری ویبریو فیبری سلونس*[2] را در شکمبه کاهش داد، اما جمعیت باکتریهای *رومینوکوکوس فلاوفسینس*[3] تحت تأثیر قرار نگرفت (Lin *et al.*, 2013). در مجموع، مطالعات محدودی اثرات اسانسهای گیاهی را بر جمعیت میکروبی شکمبه در شرایط درونتنی موردبررسی قرار دادهاند.

۳. روششناسی پژوهش

در پژوهش حاضر، اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*) و دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) از شرکت اکسیر گل سرخ (مشهد، خراسان رضوی، ایران) خریداری شدند که براساس ترکیب فعال عمده مشخص (برای اسانس آویشن ۴۸ درصد تیمول و اسانس دارچین ۷۰ درصد سینمالدئید) تهیه شده بودند. آزمایش اول با استفاده از تکنیک تولید گاز به روش Menke & Steingass (1988) در آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در این آزمایش اثر غلظتهای مختلف اسانس آویشن و دارچین بر خصوصیات تخمیری جیره پایه حاوی ۳۰ درصد علوفه (۱۰ درصد یونجه خشک، ۲۰ درصد سیلاژ ذرت) و ۷۰ درصد کنسانتره (۳۴ درصد دانه جو آسیابشده، ۱۳ درصد

1. *Fibrobacter succinogenes*
2. *Butyrivibrio fibrisolvens*
3. *Ruminococcus flavefaciens*

کنجاله تخم‌پنبه، ۲۱ درصد سبوس گندم، یک درصد کربنات کلسیم، نیم درصد مکمل ویتامینه-معدنی و نیم درصد نمک) بررسی شد. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد (جیره پایه بدون افزودنی) و یا جیره پایه به‌علاوه ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس در هر لیتر از محیط کشت بود. برای انجام این آزمایش در شرایط بی‌هوازی ۵۰ میلی‌لیتر از مایع شکمبه ترکیب‌شده با بافر (نسبت دو به یک بافر به مایع شکمبه) با استفاده از پمپ به داخل شیشه‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری که حاوی ۰/۵ گرم از جیره آزمایشی بود ریخته شد. سپس درب شیشه‌ها بسته شد و در بن‌ماری شیکردار با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. اسانس‌ها قبل از استفاده در اتانول (۹۶ درصد) حل شدند (حجم/حجم) و در تیمار شاهد نیز به همان میزان اتانول اضافه شد. در هر مرحله آزمایش سه شیشه که فقط حاوی مایع شکمبه بافری شده بود به‌عنوان بلانک (برای تصحیح گاز تولیدشده از مواد مغذی موجود در مایع شکمبه بافری‌شده) در نظر گرفته شد.

مایع شکمبه قبل از وعده خوراک صبح از سه رأس گاو شیری هلشتاین دارای فیستولای شکمبه‌ای که به‌مدت دو هفته از جیره‌ای ثابت (درصد ماده خشک؛ یونجه خشک، ۲۴؛ سیلاژ ذرت، ۱۶؛ دانه ذرت، ۲۱؛ دانه جو، ۱۴؛ کنجاله سویا ۱۰؛ کناله تخم پنبه، ۶؛ سبوس گندم، ۷؛ مکمل ویتامینه و معدنی، ۱؛ کربنات کلسیم، ۰/۳؛ نمک، ۰/۲؛ و بیکربنات سدیم، ۰/۵ و با پروتئین خام، ۱۷/۹؛ فیبر نامحلول در شوینده خنثی، ۳۳/۴؛ و انرژی خالص شیردهی، ۱/۶۲ مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) و در سطح نگهداری تغذیه می‌شدند، جمع‌آوری شد. قبل از انتقال به داخل بطری‌های شیشه‌ای، مایع شکمبه با بافر تهیه‌شده به نسبت یک به دو (یک قسمت مایع شکمبه و دو قسمت بافر) مخلوط شد. در مرحله انتقال بافر و مایع شکمبه از ارلن به بطری‌ها، جریان مداوم گاز دی‌اکسیدکربن به ارلن که در بن‌ماری ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داشت، تزریق شد. پس از اعمال تیمارهای آزمایشی و بعد از بی‌هوازی‌نمودن داخل بطری به‌وسیله تزریق گاز دی‌اکسیدکربن، درب بطری‌ها توسط درپوش لاستیکی و پرس آلومنیومی، به‌طور محکم بسته شد و بلافاصله شیشه‌ها به بن‌ماری منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. به‌منظور جلوگیری از تجمع گاز در فضای بالای شیشه‌ها، فشار گاز تولیدی در فضای بالای مایع داخل شیشه‌ها در زمان‌های چهار، هشت، ۱۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از شروع آزمایش با استفاده از دستگاه فشار سنج قرائت، ثبت و سپس تخلیه شد. در پایان دوره انکوباسیون و پس از قرائت فشار گاز، به‌منظور متوقف‌کردن فعالیت میکروبی، شیشه‌ها بلافاصله به داخل حمام آب یخ منتقل شدند. سپس به‌ترتیب همه شیشه‌ها باز و pH محیط کشت با استفاده از pH متر (Metrhom pH meter, Model 691) اندازه‌گیری و محتویات شیشه با استفاده از پارچه نایلونی با قطر منافذ ۴۸ میکرومتر صاف گردید. به‌منظور اندازه‌گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی، یک نمونه پنج میلی‌لیتری از مایع صاف‌شده هر شیشه برداشته شد و با پنج میلی‌لیتر محلول اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مواد باقی‌مانده بر روی پارچه نایلونی پس از سه مرتبه شست‌وشو با آب مقطر به دقت جمع‌آوری و در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید و تا زمان آنالیز شیمیایی در جای خشک نگهداری شد. مجموع فشار گاز تولیدشده در ۲۴ ساعت با استفاده از معادله‌ای که براساس شرایط آزمایشگاهی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و با استفاده از داده‌های واقعی به‌دست‌آمده بود به حجم تبدیل شد. میزان ماده خشک ناپدید شده پس از ۲۴ ساعت براساس اختلاف بین میزان ماده خشک موجود در نمونه اولیه با میزان ماده خشک باقی‌مانده پس از ۲۴ ساعت کشت نسبت به میزان اولیه محاسبه شد.

آزمایش دوم در واحد گاوداری مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در این آزمایش از ۱۸ رأس گوساله نر پرواری هلشتاین با میانگین وزنی ۱۷±۲۱۳ کیلوگرم در قالب طرح کامل تصادفی استفاده شد. گوساله‌ها با جیره‌های حاوی ۱۵ درصد علوفه و ۸۵ درصد کنسانتره تا حد اشتها تغذیه شدند. طول دوره آزمایش ۸۰ روز بود که ۳۵ روز به‌منظور

عادت‌پذیری و ۴۵ روز برای دوره اصلی آزمایش در نظر گرفته شد. در طی دوره عادت‌پذیری، گوساله‌ها با استفاده از جیره‌های انتقالی (هرکدام به‌مدت یک هفته) به‌صورت تدریجی به جیره پایانی آزمایش عادت داده شدند. جیره‌های انتقالی حاوی مقادیر افزایشی کنسانتره: ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۸۵ درصد از جیره مخلوط براساس درصد ماده خشک بودند. تراکم مواد مغذی جیره پایه بر مبنای جداول استاندارد احتیاجات غذایی برای گاوهای گوشتی NRC (1996) تنظیم شد. اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه در جدول (۱) نشان داده شده است. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)، ۲- آویشن (جیره پایه به‌علاوه ۵ گرم اسانس آویشن در روز به‌ازای هر رأس گوساله) و ۳- دارچین (جیره پایه به‌علاوه ۵ گرم اسانس دارچین در روز به‌ازای هر رأس گوساله) بودند.

در طول دوره آزمایش، جیره‌ها دو بار در روز در ساعات هشت و ۱۶ در اختیار گوساله‌ها قرار گرفتند. اسانس آویشن و دارچین با بخشی از کنسانتره مخلوط‌شده و روزانه یک بار به‌عنوان بخشی از کل جیره مخلوط بلافاصله قبل از تغذیه در اختیار گوساله‌ها قرار می‌گرفت تا اطمینان حاصل شود که به‌صورت کامل به‌وسیله گوساله‌ها مصرف شده است. گوساله‌ها در تمام مدت آزمایش در جایگاه‌های انفرادی نگهداری شده و به‌طور آزاد به آب و نمک دسترسی داشتند. باقیمانده خوراک گوساله‌های هر گروه آزمایشی هر روز صبح جمع‌آوری و توزین می‌شد و میزان مصرف روزانه خوراک اندازه‌گیری شد. وزن‌کشی گوساله‌ها در شروع و پایان آزمایش انجام شد. برای این منظور، ۱۴ تا ۱۶ ساعت قبل از وزن کشی (چهار بعدازظهر تا هشت صبح روز بعد) گوساله‌ها از خوراک محروم شده (اما به آب دسترسی داشتند) و سپس توزین و میانگین افزایش وزن روزانه محاسبه شد.

جدول ۱. اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیبات شیمیایی جیره پایه گوساله‌های پرواری هلشتاین

اجزای جیره غذایی	درصد	ترکیب شیمیایی	درصد ماده خشک
یونجه خشک	۱۵	ماده خشک	۹۳/۱
دانه ذرت آسیاب‌شده	۳۴	پروتئین خام	۱۵/۵
دانه جو آسیاب‌شده	۳۴	چربی خام	۲/۸
کنجاله تخم پنبه	۱۱	خاکستر	۶/۴
کنجاله سویا	۵	فیبر نامحلول در شوینده خنثی	۲۱/۵
کربنات کلسیم	۰/۵	فیبر نامحلول در شوینده اسیدی	۱۲/۳
مکمل ویتامینه- معدنی*	۰/۲	کلسیم	۰/۵۳
نمک	۰/۳	فسفر	۰/۳۵

* حاوی ۲۰ گرم در کیلوگرم منیزیم، ۵۰ گرم در کیلوگرم پتاسیم، ۳۰ گرم در کیلوگرم روی، ۲۰ گرم در کیلوگرم منگنز، ۳۰ گرم در کیلوگرم آهن، ۳ گرم در کیلوگرم مس، ۰/۰۱ گرم در کیلوگرم سلنیوم، ۰/۱ گرم در کیلوگرم کبالت، ۰/۱ گرم در کیلوگرم ید، ۵۰۰ واحد در گرم ویتامین A، ۱۰۰ واحد در گرم ویتامین D و ۱ واحد در گرم ویتامین E.

در روز پایانی آزمایش، برای تعیین pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرّار، و هم‌چنین بررسی جمعیت میکروبی، از کل محتویات شکمبه (بخش مایع و جامد) به میزان ۵۰ گرم نمونه از طریق کانال گوارشی (مری) و با استفاده از پمپ خلأ قبل از خوراک‌دهی برداشته و درون ظروف مخصوص نمونه‌گیری ریخته شد. pH مایع شکمبه بلافاصله توسط pHمتر دیجیتال (مدل ۶۹۱، شرکت Metrohm) ثبت شد. جهت اندازه‌گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی، مایع شکمبه به نسبت ۱:۱ با اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هم‌چنین نمونه مایع شکمبه سه ساعت پس از خوراک‌دهی برای تعیین اسیدهای چرب فرّار شکمبه گرفته شد و به نسبت یک به چهار با متافسفریک‌اسید ۲۵ درصد مخلوط و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت اندازه‌گیری ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، خاکستر و عناصر معدنی جیره پایه از روش‌های توصیه‌شده

استاندارد آزمایشگاهی AOAC (2005) استفاده شد. فیبر نامحلول در شوینده خنثی و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری فیبر (1010 Heat Extractor, Tecator, Sweden) و براساس روش Van Soest *et al*. (1991) تعیین شد. هم‌چنین از سولفیت‌سدیم و آنزیم آلفا–آمیلاز مقاوم به حرارت (Sigma A3306; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) در طی فرایند تجزیه شیمیایی فیبر استفاده شد. غلظت اسیدهای چرب فرّار نمونه‌ها با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (Chrompack, Model CP-9002, Chrompack, EA Middelburg, Netherlands) تعیین شد. به‌طور خلاصه، در این دستگاه از ستونی با طول ۵۰ متر و قطر ۰/۳۲ میلی‌متر (CP-Wax Chrompack Capillary Column,Varian, PaloAlto, CA, USA) استفاده شد. هلیوم به‌عنوان گاز حامل استفاده شد و در دمای اولیه و پایانی به‌ترتیب روی ۵۵ و ۱۹۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای تشخیص‌دهنده و تزریق‌کننده نیز ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. کرتونیک اسید (۱:۷ حجمی) به‌عنوان استاندارد داخلی به تمامی نمونه‌ها تزریق شد. تولید متان در آزمایش حاضر به‌روش مستقیم اندازه‌گیری نشد و با استفاده از غلظت‌های اسیدهای چرب فرّار و براساس معادله پیشنهادی Moss *et al*. (2000) تخمین زده شد.

استخراج DNA از محتویات شکمبه با استفاده از پروتکل ارائه‌شده در کیت استخراج بایونیر (AccuPrepTM, Bioneer Corporation, Daejeon, South Korea) انجام شد. جمعیت کل باکتری‌های آزاد، پروتوزوآ، و باکتری‌های متانوژنز، *فیبروباکتر سوکسینوژنز*، *رومینوکوکوس آلبوس*[1] و *رومینوکوکوس فلاوفسینس* در محتویات شکمبه گاوها قبل از خوراک صبحگاهی با استفاده از روش Real-Time PCR تعیین شد. تغییر در جمعیت باکتری‌های محتویات شکمبه گوساله‌های مصرف‌کننده تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گوساله‌های مصرف‌کننده جیره شاهد با استفاده از روش نسبی محاسبه شد. پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه در جدول (۲) گزارش شده است. داده‌های حاصل با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (2004) در قالب طرح کاملاً تصادفی برای مدل (۱) تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از روش Lsmeans در سطح معنی‌داری پنج درصد مقایسه شدند.

$$Y_{ijk}= \mu+T_i+\varepsilon_{ij}$$ رابطه ۱)

که در آن، Y_{ijk}، مقدار هر مشاهده؛ μ، میانگین کل؛ T_i، اثر تیمار و ε_{ij}، خطای آزمایشی است.

جدول ۲. طول قطعه و توالی پرایمرهای مورداستفاده در Real-Time PCR

میکروارگانیسم	طول قطعه	پرایمر	توالی	منبع
کل باکتری‌ها	۱۲۰	توالی رفت	GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA	Maeda و همکاران (۲۰۱۰)
		توالی برگشت	ACGTCRTCCMCACCTTCCTC	
پروتوزوآ	۲۲۳	توالی رفت	GCTTTCGWTGGTAGTGTATT	Denman و همکاران (۲۰۰۷)
		توالی برگشت	CTTGCCCTCYAATCGTWCT	
باکتری‌های متانوژنز	۱۴۰	توالی رفت	TTCGGTGGATCDCARAGRGC	Denman و همکاران (۲۰۰۷)
		توالی برگشت	GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	
فیبروباکتر سوکسینوژنز	۱۲۱	توالی رفت	GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA	Zhang و همکاران (۲۰۰۸)
		توالی برگشت	CGCCTGCCCCTGAACTATC	
رومینوکوکوس آلبوس	۱۷۵	توالی رفت	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	Denman و همکاران (۲۰۰۷)
		توالی برگشت	CCTCCTTGCGGTTAGAACA	
رومینوکوکوس فلاوفسینس	۱۳۲	توالی رفت	CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG	Zhang و همکاران (۲۰۰۸)
		توالی برگشت	CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	

1. *Ruminococcus albus*

۴. یافته‌های پژوهش

اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن و دارچین بر فراسنجه‌های تخمیری در شرایط آزمایشگاهی کشت بسته به‌ترتیب در جدول‌های (۳) و (۴) گزارش شده است. غلظت‌های بیش از ۲۵۰ میلی‌گرم اسانس آویشن و دارچین موجب کاهش کل گاز تولیدی نسبت به تیمار شاهد شدند (P<۰/۰۵). این در حالی است که تنها غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر هر یک از اسانس‌ها، موجب کاهش ناپدید شدن ماده خشک شد (P<۰/۰۵). دُزهای مختلف اسانس آویشن تأثیری بر pH نهایی محیط کشت نداشتند و تنها دُز ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس دارچین باعث افزایش pH شد که ممکن است ناشی از غلظت‌های پایین‌تر اسیدهای چرب فرّار در نتیجه تخمیرپذیری پایین‌تر جیره در این تیمار باشد.

جدول ۳. اثر اسانس آویشن بر فراسنجه‌های تخمیر میکروبی شکمبه در شرایط برون‌تنی کشت بسته

فراسنجه‌های تخمیری	غلظت اسانس آویشن (میلی‌گرم در لیتر)					خطای معیار میانگین‌ها	معنی‌داری
	صفر	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰		
کل تولید گاز[۱]	۱۶۹/۲^{a}	۱۶۱/۴^{a}	۱۲۸/۵^{b}	۹۲/۸^{c}	۵۴/۳^{d}	۵/۱۵	<۰/۰۱
ناپدید شدن ماده خشک[۱]	۶۵/۵^{a}	۵۹/۴^{ab}	۵۶/۴^{ab}	۵۰/۷^{bc}	۴۴/۶^{c}	۳/۳۳	۰/۰۱
pH	۶/۳۲	۶/۲۵	۶/۲۷	۶/۲۷	۶/۳۰	۰/۰۳۸	۰/۴۹
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۳۷/۱^{a}	۳۸/۶^{a}	۳۱/۴^{ab}	۲۸/۲^{ab}	۲۴/۵^{b}	۲/۴۴	۰/۰۲
اسیدهای چرب فرّار کل (میلی‌مول)	۱۲۴/۷^{a}	۱۲۶/۰^{a}	۱۲۲/۵^{a}	۱۱۷/۸ ^{ab}	۱۰۳/۶^{b}	۴/۵۹	۰/۰۴
اسیدهای چرب فرّار (مول در ۱۰۰ مول)							
استات	۵۹/۳	۵۷/۵	۵۵/۸	۵۸/۲	۵۷/۰	۲/۶۰	۰/۹۴
پروپیونات	۲۱/۳	۲۵/۰	۲۵/۷	۲۳/۷	۲۳/۴	۱/۳۸	۰/۱۱
بوتیرات	۱۲/۴	۱۲/۳	۱۲/۸	۱۳/۱	۱۲/۸	۰/۵۲	۰/۳۵
اسیدهای چرب شاخه دار	۳/۷۰	۳/۱۵	۳/۰۴	۲/۹۵	۳/۵۸	۰/۴۳	۰/۵۶
استات : پروپیونات	۲/۷۸^{a}	۲/۳۰^{b}	۲/۲۷^{b}	۲/۴۵^{ab}	۲/۴۳^{ab}	۰/۰۹	۰/۰۲
متان (مول در ۱۰۰ مول)[۲]	۳۴/۴^{a}	۳۲/۰^{a}	۳۰/۵^{ab}	۳۱/۳^{a}	۲۷/۶^{b}	۰/۵۷	۰/۰۴

۱. میلی‌لیتر به‌ازای یک گرم ماده خشک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون؛ ناپدید شدن ماده خشک (گرم در کیلوگرم ماده خشک) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون.
۲. محاسبه‌شده براساس معادله Moss *et al.* (2000): تولید متان = ۰/۴۵ × (استات) − ۰/۲۷۵ (پروپیونات) + ۰/۴ (بوتیرات)
اعداد با حروف غیر مشابه در هر ردیف اختلافشان در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار است.

جدول ٤. اثر اسانس دارچین بر فراسنجه‌های تخمیر میکروبی شکمبه در شرایط برون‌تنی کشت بسته

فراسنجه‌های تخمیری	غلظت اسانس دارچین (میلی‌گرم در لیتر)					خطای معیار میانگین‌ها	معنی‌داری
	صفر	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰		
کل تولید گاز[۱]	۱۶۹/۲^{a}	۱۶۵/۲^{a}	۱۴۲/۲^{b}	۱۱۲/۰^{c}	۹۱/۳^{d}	۵/۷۵	<۰/۰۱
ناپدیدشدن ماده خشک**	۶۵/۵^{a}	۶۶/۱^{a}	۶۳/۲^{a}	۶۰/۹^{ab}	۵۵/۷^{b}	۲/۲۵	۰/۰۴
pH	۶/۳۲^{b}	۶/۳۶^{b}	۶/۴۱^{ab}	۶/۳۸^{ab}	۶/۵۱^{a}	۰/۰۴۳	۰/۰۵
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۳۷/۱^{a}	۳۵/۲^{a}	۳۵/۹^{a}	۳۱/۰^{ab}	۲۵/۴^{b}	۱/۹۶	۰/۰۱
اسیدهای چرب فرّار کل (میلی‌مول)	۱۲۴/۷^{a}	۱۲۳/۲^{a}	۱۲۰/۹^{a}	۱۱۵/۴^{ab}	۱۰۷/۶^{b}	۳/۸۸	۰/۰۵
اسیدهای چرب فرّار (مول در ۱۰۰ مول)							
استات	۵۹/۳	۵۸/۱	۵۶/۴	۵۷/۲	۵۸/۷	۲/۳۵	۰/۸۹
پروپیونات	۲۱/۳	۲۳/۸	۲۴/۴	۲۲/۳	۲۰/۷	۱/۴۸	۰/۰۶
بوتیرات	۱۲/۴	۱۲/۷	۱۳/۵	۱۳/۸	۱۳/۰	۰/۴۷	۰/۱۳
اسیدهای چرب شاخه‌دار	۳/۷۰	۲/۹۰	۳/۱۹	۳/۸۵	۳/۹۷	۰/۶	۰/۴۳
استات : پروپیونات	۲/۷۸^{a}	۲/۴۴^{b}	۲/۳۱^{b}	۲/۵۶^{b}	۲/۸۳^{a}	۰/۱۱	۰/۰۳
متان (مول در ۱۰۰ مول)***	۳۴/۴	۳۲/۵	۳۱/۱	۲۹/۹	۳۱/۱	۰/۴۹	۰/۰۷

۱. میلی‌لیتر به‌ازای یک گرم ماده خشک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون؛ ناپدید شدن ماده خشک (گرم در کیلوگرم ماده خشک) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون.
۲. محاسبه‌شده براساس معادله Moss *et al.* (2000): تولید متان = ۰/۴۵ × (استات) − ۰/۲۷۵ (پروپیونات) + ۰/۴ (بوتیرات)
اعداد با حروف غیر مشابه در هر ردیف اختلافشان در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار است.

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن و دارچین بر غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه نشان می‌دهد که فقط غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس‌های گیاهی موجب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت بسته پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون شده است. غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس آویشن نیز موجب کاهش غلظت اسیدهای چرب فرّار کل شد (P<۰/۰۵)، اما بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. نسبت مولی استات و پروپیونات تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن قرار نگرفت. نسبت استات به پروپیونات برای غلظت‌های کم‌تر از ۵۰۰ میلی‌گرم اسانس آویشن نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵). غلظت بوتیرات و اسیدهای چرب شاخه‌دار با افزودن سطوح مختلف اسانس آویشن تغییری نکرد. نتایج تقریباً مشابهی برای اسانس دارچین به‌دست آمد، با این تفاوت که غلظت‌های کم‌تر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس دارچین موجب کاهش نسبت استات به پروپیونات شدند (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از اثرات تیمارهای آزمایشی بر تولید متان نشان می‌دهد که تنها غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس آویشن موجب کاهش تولید متان شده است (P<۰/۰۵).

اثر اسانس آویشن و دارچین بر عملکرد و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه گوساله‌های نر پرواری هلشتاین در جدول (۵) ارائه شده است. اگرچه ضریب تبدیل خوراک تمایل به بهبودی نشان داد، اما میانگین مصرف ماده خشک و افزایش وزن روزانه گوساله‌های پرواری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. افزودن اسانس آویشن و دارچین به جیره گوساله‌های پرواری تأثیر معنی‌داری بر pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و غلظت کل اسیدهای چرب فرّار شکمبه نداشت، اما باعث افزایش پروپیونات و کاهش استات و نسبت استات به پروپیونات شد (P<۰/۰۵). غلظت بوتیرات نیز با افزودن اسانس دارچین افزایش یافت (P<۰/۰۵).

جدول ۵. اثر اسانس آویشن و دارچین بر مصرف خوراک، افزایش وزن روزانه و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه گوساله‌های پرواری هلشتاین

صفت موردمطالعه	تیمارهای آزمایشی*			خطای معیار میانگین‌ها	معنی‌داری
	شاهد	آویشن	دارچین		
صفات عملکردی					
وزن اولیه (کیلوگرم)	۲۱۲/۵	۲۱۴/۲	۲۱۵/۰	۹/۲۴	۰/۹۸
وزن نهایی (کیلوگرم)	۲۶۶/۵	۲۷۳/۱	۲۷۱/۷	۸/۶۷	۰/۸۵
ماده خشک مصرفی (گرم در روز)	۷۹۸۰	۸۱۱۵	۷۸۴۰	۱۸۴	۰/۴۷
افزایش وزن روزانه (گرم در روز)	۱۱۸۸	۱۳۱۰	۱۲۶۸	۳۹	۰/۱۵
ضریب تبدیل غذایی	۶/۶۹	۶/۲۰	۶/۱۷	۰/۱۱۸	۰/۰۸
فراسنجه‌های تخمیری شکمبه					
pH	۵/۹۸	۵/۹۴	۵/۸۷	۰/۰۹۱	۰/۶۹
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۱۵/۹	۱۵/۸	۱۵/۷	۰/۹۳	۰/۹۸
اسیدهای چرب فرّار کل (میلی‌مول)	۱۱۲/۲	۱۱۱/۵	۱۰۹/۹	۱/۶۴	۰/۶۲
اسیدهای چرب فرّار (مول در ۱۰۰ مول)					
استات	۵۸/۸^{a}	۵۲/۹^{b}	۵۳/۵^{b}	۱/۳۹	۰/۰۲
پروپیونات	۲۴/۷^{b}	۲۹/۶^{a}	۲۸/۱^{a}	۰/۹۹	۰/۰۱
بوتیرات	۱۲/۶^{b}	۱۳/۴^{ab}	۱۴/۴^{a}	۰/۴۱	۰/۰۳
استات : پروپیونات	۲/۳۹^{a}	۱/۸۰^{b}	۱/۹۲^{b}	۰/۱۲۰	۰/۰۱

* تیمارهای آزمایشی شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)؛ آویشن (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس آویشن در روز به‌ازای هر رأس گوساله)؛ دارچین (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس دارچین در روز به‌ازای هر رأس گوساله).

اعداد با حروف غیرمشابه در هر ردیف اختلافشان در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار است.

اثرات تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی شکمبه گوساله‌های پرواری در جدول (۶) گزارش شده است. جمعیت نسبی پروتوزوآ و باکتری‌های تولیدکننده متان در شکمبه گوساله‌های تغذیه‌شده با اسانس‌های گیاهی کاهش نشان داد (P<۰/۰۵) که برای اسانس آویشن شدیدتر بود. جمعیت باکتری‌های سلولایتیک *فیبروباکتر سوکسینوژنز* بین تیمارها مشابه بود، اما جمعیت باکتری‌های *رومینوکوکوس آلبوس* به هنگام استفاده از اسانس‌های گیاهی کاهش داشت (P<۰/۰۵). جمعیت باکتری‌های *رومینوکوکوس فلاوفسینس* نیز با افزودن اسانس آویشن کاهش نشان داد (P<۰/۰۵).

جدول ٦. اثر اسانس آویشن و دارچین بر جمعیت میکروبی شکمبه گوساله‌های پرواری هلشتاین

جمعیت میکروبی شکمبه	تیمارهای آزمایشی*			خطای معیار میانگین‌ها	معنی‌داری
	شاهد	آویشن	دارچین		
پروتوزوآ	۱/۰۰^{a}	۰/۲۷۷^{c}	۰/۵۲۱^{b}	۰/۰۶۹	<۰/۰۱
متانوژنز	۱/۰۳^{a}	۰/۴۰۸^{b}	۰/۴۸۹^{b}	۰/۰۹۴	<۰/۰۱
فیبروباکتر سوکسینوژنز	۱/۰۰	۱/۰۴	۰/۹۸۳	۰/۳۲۹	۰/۶۲
رومینوکوکوس آلبوس	۱/۰۱^{a}	۰/۷۴۸^{b}	۰/۷۲۵^{b}	۰/۱۱۰	۰/۰۱
رومینوکوکوس فلاوفسینس	۱/۰۱^{a}	۰/۶۷۳^{ab}	۰/۸۳۵^{ab}	۰/۲۴۲	۰/۰۴

* تیمارهای آزمایشی: شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)؛ آویشن (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس آویشن در روز به‌ازای هر رأس گوساله)؛ دارچین (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس دارچین در روز به‌ازای هر رأس گوساله).

اعداد با حروف غیر مشابه در هر ردیف اختلافشان در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار است.

۵. بحث

کاهش گاز تولیدی و ناپدیدشدن ماده خشک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی در سطوح بالای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس آویشن و دارچین می‌تواند نشان‌دهنده فعالیت ضدمیکروبی کلی و غیر اختصاصی اسانس‌ها در مقابل طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های شکمبه باشد. اما، در غلظت‌های پایین‌تر اسانس، تولید گاز کاهش محسوسی داشت، درحالی‌که ناپدید شدن ماده خشک بدون تغییر باقی ماند. این امر بیانگر این است که احتمالاً تنها جمعیت‌های خاصی از میکروارگانیسم‌های شکمبه در این غلظت‌ها تحت تأثیر واقع شده‌اند. در پژوهشی مشابه، افزودن اسانس آویشن و دارچین تولید گاز را تا میزان زیادی کاهش داد که وابسته به دُز مصرفی بود (Macheboeuf *et al*., 2008). نتایج حاصل از مطالعه Jahani-Azizabadi *et al*. (2011) نشان داد که مقادیر ۲۸۰ میکرولیتر اسانس دارچین و آویشن به‌ازای هر لیتر محیط کشت، به‌ترتیب ناپدید شدن ماده خشک را ۶/۲ و ۱۱/۷ درصد در جیره حاوی ۸۰ درصد کنسانتره و ۷/۸ و ۲۱/۵ درصد در جیره حاوی ۵۰ درصد کنسانتره کاهش داد. افزایش pH در تیمار حاوی غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس دارچین ممکن است ناشی از غلظت‌های پایین‌تر اسیدهای چرب فرّار در نتیجه تخمیرپذیری پایین‌تر جیره باشد.

کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط کشت در تیمارهای با غلظت بالای اسانس آویشن و دارچین در این پژوهش می‌تواند بیانگر تأثیر اسانس بر کاهش فعالیت باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین و تولیدکننده آمونیاک بالا در مایع شکمبه و یا کاهش فعالیت آمین‌زدایی باکتری‌هایی باشد که از پپتیدها و اسیدهای آمینه به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کنند (McIntosh *et al*., 2003). غلظت‌های بالای اسانس‌های مورداستفاده موجب غلظت پایین‌تر اسیدهای چرب فرّار شدند، که اثرات ضد میکروبی آن‌ها را تأیید می‌نماید. در آزمایشی مشابه در شرایط برون‌تنی، استفاده از دزهای بالای اسانس دارچین غلظت اسیدهای چرب فرّار کل را کاهش داد (Busquet *et al*., 2006). هم‌چنین، استفاده از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس آویشن در یک کشت مداوم دو طرفه موجب کاهش غلظت اسیدهای چرب فرّار کل و نسبت مولی استات و افزایش نسبت

مولی پروپیونات شد (Castillejos *et al*., 2006). براساس نتایج پژوهش‌های منتشرشده، تأثیر اسانس‌های گیاهی بر تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری در یک محیط کشت بسته می‌تواند تحت تأثیر غلظت و منبع اسانس، نوع جیره پایه، پروتکل و تکنیک آزمایشگاهی و دام‌های مورداستفاده برای جمع‌آوری مایع شکمبه قرار گیرد (Calsamiglia *et al*., 2007).

با توجه به این‌که مصرف ماده خشک تحت تأثیر افزودن اسانس‌های گیاهی به جیره قرار نگرفت، عدم تغییر در میانگین افزایش وزن روزانه گوساله‌های تغذیه‌شده با تیمارهای مختلف قابل انتظار بود. نتایج مشابهی روی گاوها (Castro Filho *et al*., 2021) و بره‌های پرواری (رحمتی‌زاده و همکاران، ۱۴۰۱) گزارش شده است. اثر تغذیه اسانس‌های گیاهی بر عملکرد دام‌های پرواری بسیار متغیر است، که بخشی از این تنوع می‌تواند مربوط به نوع اسانس مورداستفاده، دز مصرفی، نوع جیره، سطح تولید و شرایط فیزیولوژی حیوان باشد (Calsamiglia *et al*., 2007). به‌دلیل عدم تغییر ماده خشک مصرفی و غلظت اسیدهای چرب فرّار کل، pH شکمبه نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت که با پژوهش‌های گذشته در گوسفند (Chaves *et al*., 2008a) و گاوهای گوشتی (Yang *et al*., 2010a; Fandino *et al*., 2008) همسو می‌باشد. برخی مطالعات روی حیوان (Castro Filho *et al*., 2021; Yang *et al*., 2010a) عدم تأثیر اسانس‌های گیاهی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه را گزارش نموده‌اند که با یافته‌های ما در این پژوهش همخوانی دارد. عدم تأثیر اسانس‌های گیاهی بر سوخت‌وساز نیتروژن در مطالعات بلندمدت (آزمایش‌های حیوانی) در مقایسه با مطالعات کوتاه‌مدت (آزمایشگاهی) می‌تواند به‌مدت زمان‌های طولانی‌تری که میکروب‌های شکمبه در معرض اسانس‌های گیاهی قرار می‌گیرند ارتباط داشته باشد. بنابراین، بخشی از تفاوت‌های موجود در رابطه با اثر اسانس‌های گیاهی بر pH و نیتروژن آمونیاکی بین مطالعات آزمایشگاهی و حیوانی می‌تواند به‌واسطه ظرفیت میکروب‌های شکمبه به عادت‌پذیری یا تجزیه ترکیبات اسانس‌های گیاهی باشد.

عدم تأثیر اسانس آویشن و دارچین بر غلظت اسیدهای چرب فرّار کل در مطالعه حاضر با عدم تغییرات در ماده خشک مصرفی منطبق بوده و نتایج سایر پژوهش‌گران را تأیید می‌نماید (Castro Filho *et al*., 2021; Benchaar, 2021). یافته‌های مطالعات مشابه در گذشته نشان داده‌اند که بعضی از اسانس‌های گیاهی و ترکیبات فعال آن‌ها نسبت‌های اسیدهای چرب فرّار را مشابه مونسین (یعنی کاهش استات و افزایش پروپیونات) تغییر می‌دهند که به لحاظ تغذیه‌ای سودمند می‌باشد، زیرا پروپیونات یکی از منابع عمده انرژی قابل سوخت‌وساز برای نشخوارکنندگان محسوب می‌شود. کاهش در نسبت استات به‌دنبال افزودن اسانس ممکن است به‌دلیل مهار باکتری‌های تولیدکننده استات باشد که بیش‌تر به باکتری‌های گرم مثبت در شکمبه تعلق دارند که به اسانس‌های گیاهی حساس‌تر هستند (McIntosh *et al*., 2003). بنابراین، این گمان می‌رود که اسانس آویشن و دارچین رشد باکتری‌های سلولایتیک را که معمولاً تولیدکننده‌های استات هستند، کاهش دهند که در مطالعه حاضر مشاهده شد. پروپیونات یکی از محصولات نهایی مهم تخمیر میکروبی شکمبه به‌شمار می‌رود که برای تشکیل نیازمند هیدروژن است. از این‌رو، مهار تولید متان معمولاً با افزایش در تولید پروپیونات همراه است، و یک ارتباط منفی منطقی بین تولید پروپیونات و فعالیت متانوژنیک وجود دارد. این ارتباط می‌تواند به‌صورت چرخه‌های رقابتی برای استفاده از هیدروژن متابولیکی در شکمبه توضیح داده شود (Moss *et al*., 2000).

با توجه به کاهش جمعیت باکتری‌های تولیدکننده متان در تیمارهای حاوی اسانس آویشن و دارچین، احتمالاً مهار مستقیم تولید متان منجر به پیدایش هیدروژن اضافی در شکمبه شده و حذف هیدروژن اضافی نیازمند این است که به سمت یک منبع جایگزین برای استفاده هیدروژن مانند پروپیونات منحرف شود (Moss *et al*., 2000). در نتیجه، افزایش معنی‌دار در غلظت پروپیونات ممکن است مربوط به کاهش فرایند تولید متان باشد، هرچند در این مطالعه متان به‌طور مستقیم اندازه‌گیری نشد. در همین راستا نتایج مطالعه Jahani-Azizabadi *et al*. (2011) نشان داد که اسانس

آویشن و دارچین اثرات مهارکنندگی زیادی بر تولید متان در شرایط برون‌تنی با کاهش فعالیت باکتری‌های متانوژنز شکمبه دارند. براساس نتایج پژوهش‌های منتشرشده، به‌نظر می‌رسد اثرات اسانس‌های گیاهی بر تخمیر میکروبی شکمبه وابسته به نوع جیره و pH باشد (Castillejos *et al*., 2006). اثر pH بر پاسخ اسانس آویشن و دارچین ممکن است به حالت یونی (آب‌دوست) و غیریونی (آبگریز) مولکول‌های فعال ارتباط داشته باشد. در نتیجه، برخی از اسانس‌های گیاهی مانند آویشن و دارچین این توانایی بالقوه را دارند که الگوی اسیدهای چرب فرّار را در pH پایین شکمبه بهبود بخشند که برای سیستم‌های پرواری می‌تواند سودمند باشد.

افزودن اسانس آویشن و دارچین به جیره، جمعیت پروتوزوآی شکمبه را کاهش داد. اثرات ضد پروتوزوآیی اسانس‌های گیاهی قبل از این نیز گزارش شده است (Anassori *et al*., 2011; Benchaar, 2021; Fandino *et al*., 2008). سازوکار عمل اسانس دارچین به‌خوبی روشن نیست، اما سازوکار عمل ترکیب عمده آن سینمالدئید ممکن است مربوط به اثرات متقابل آن با پروتئین‌ها در پری‌پلاسم یا بخش‌های درونی‌تر سلول باشد (Helander *et al*., 1998). اثر هر یک از اسانس‌های گیاهی وابسته به ساختار آن می‌باشد، که نتیجه‌ای از ساختمان شیمیایی و نوع گروه عاملی آن است (Cieslak *et al*., 2013). بنابراین فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن به احتمال زیاد مربوط به ساختار فنولیک ترکیب فعال آن یعنی تیمول مربوط می‌شود (Helander *et al*., 1998). ترکیبات ثانویه گیاهی با ساختارهای فنولیک، مانند تیمول، به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی در مقایسه با ترکیبات غیرفنولیک به‌خاطر وجود یک گروه هیدروکسیل مؤثرتر هستند. ساختار فنولیک می‌تواند منجر به تخریب غشای سلولی، غیرفعال سازی آنزیم‌ها و کمبود سوبستراهایی گردد که برای سوخت‌وساز سلول ضروری هستند. اثرات ضد پروتوزوآیی اسانس آویشن احتمالاً به‌دلیل خاصیت آب‌گریزی آن می‌باشد که در غشای سلولی پروتوزوآ نفوذ کرده و در چرخه‌های متابولیکی سیتوزولی دخالت می‌نماید (Calsamiglia *et al*., 2007).

کاهش در جمعیت باکتری‌های تولیدکننده متان شکمبه به‌واسطه استفاده از اسانس آویشن و دارچین یافته‌های سایر مطالعات را تأیید می‌کند (Lin *et al*., 2013; McIntosh *et al*., 2003)، اگرچه تولید متان مستقیما در آزمایش حاضر تعیین نشد، نسبت استات به پروپیونات کاهش یافت، هم‌چنین از تعداد پروتوزوآ و متانوژنزها کاسته شد، که نشان می‌دهد تولید متان ممکن است توسط اسانس آویشن و دارچین مهار شده باشد، اگرچه مهار تولید متان در شکمبه همیشه با کاهش جمعیت باکتری‌های تولیدکننده متان همراه نیست (Cieslak *et al*., 2013). برخی مطالعات نشان داده‌اند که اسانس‌های گیاهی می‌توانند باکتری‌های تولیدکننده متان را از طریق کاهش پروتوزوآ کاهش دهند. یک رابطه همزیستی مستقیم میان تعداد پروتوزوآی شکمبه و متانوژنزها وجود دارد، به‌طوری‌که پروتوزوآ یک محل سکونت برای متانوژنزها فراهم می‌آورند که در آن و در میان آن‌ها زندگی می‌کنند. بر این اساس، متانوژنزهایی که در شکمبه با پروتوزوآ همراه هستند، هنگامی‌که از تعداد پروتوزوآ کاسته می‌شود، کاهش می‌یابند (Klieve & Hegarty, 1999). در همین راستا، Chaves *et al*. (2008a) نشان دادند که اسانس دارچین اثرات ضد میکروبی‌اش را از طریق مهار مستقیم متانوژنزهای شکمبه اعمال می‌کند. علاوه بر این، همراه با اثرات سمی اسانس‌های گیاهی بر متانوژنزها، کاهش تعداد متانوژنزها ممکن است نتیجه کاهش گونه‌های باکتریایی مانند رومینوکوکوس‌ها باشد که تأمین‌کننده سوبسترا برای آن‌ها به شکل هیدروژن می‌باشند (Cieslak *et al*., 2013). بنابراین، افزودن اسانس‌های گیاهی می‌تواند به‌طور غیرمستقیم مقدار تولید متان را در شکمبه با کاهش تعداد باکتری‌های رومینوکوکوس آلبوس و رومینوکوکوس فلاوفسینس کاهش دهد که در این پژوهش مشاهده شد.

در مطالعه حاضر، باکتری‌های سلولایتیک *رومینوکوکوس آلبوس* و *رومینوکوکوس فلاوفسینس* توسط اسانس‌های گیاهی مهار شدند، اما *فیبروباکتر سوکسینوژنز* تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. Benchaar *et al*. (2012) نشان دادند که افزودن یوگنول (جزء مهم اسانس دارچین) در جیره گاوهای شیری تأثیری بر تعداد باکتری‌های *فیبروباکتر سوکسینوژنز* در

شکمبه ندارد. در آزمایشی که توسط Lin *et al*. (2013) بر روی گوسفند انجام گرفت، جمعیت باکتری‌های فیبروباکتر سوکسینوژنز و بوتیری ویبریو فیبری سلونس در شکمبه گوسفندان تغذیه‌شده با اسانس دارچین کاهش یافت، اما جمعیت باکتری رومینوکوکوس فلاوفسینس تحت تأثیر قرار نگرفت. براساس یافته‌های موجود، به‌نظر می‌رسد باکتری‌های گرم منفی به‌دلیل غشای خارجی محافظ که اطراف دیواره سلولی را احاطه کرده است در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت به اسانس‌های گیاهی مقاوم‌تر باشند (Helander *et al*., 1998). بنابراین، کاهش در فراوانی نسبی رومینوکوکوس آلبوس و فلاوفسینس (باکتری‌های گرم مثبت) در مقایسه با فیبروباکتر سوکسینوژنز (باکتری گرم منفی) در پژوهش حاضر ممکن است به همین دلیل باشد. اسانس آویشن برخلاف اسانس دارچین جمعیت باکتری رومینوکوکوس فلاوفسینس را کاهش داد که می‌تواند به‌دلیل خاصیت ضدمیکروبی قوی‌تر ترکیب فنولیک تیمول موجود در آن باشد. علاوه بر این، ممکن است ترکیبات فعال اسانس آویشن بر دیگر ساختارهای سلولی باکتری نیز تأثیر گذاشته باشند.

۶. نتیجه‌گیری

براساس نتایج حاصل، هرچند مکمل‌سازی جیره با اسانس آویشن و دارچین بر عمکرد گوساله‌های پرواری تأثیر معنی‌داری نداشت، اما ویژگی‌های تخمیری شکمبه را بهبود داد. بنابراین، اسانس‌های آویشن و دارچین می‌توانند با تغییر جمعیت‌های میکروبی به سمت بهبود الگوی تخمیری شکمبه (یعنی افزایش نسبت مولی پروپیونات و کاهش تولید متان) اثرات مطلوبی بر بازده غذایی در سیستم‌های پرواری به‌دنبال داشته باشند و ممکن است بتوان از آن‌ها به‌عنوان جایگزین‌های بالقوه آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره استفاده نمود.

۷. تشکر و قدردانی

از مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بابت حمایت مالی طرح و از مدیریت و کارکنان محترم گاوداری مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به‌خاطر فراهم‌نمودن امکانات و شرایط لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۹. منابع

رحمتی‌زاده، مرضیه؛ هژبری، فردین؛ و کفیل‌زاده، فرخ (۱۴۰۱). تأثیر افزودن مخلوطی از اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری به جیره بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و متابولیت‌های خون بره‌های پرواری. *علوم دامی ایران*، ۵۳ (۴)، ۲۸۵-۲۷۳.

References

Anassori, E., Dalir-Naghaden, B., Pirmohammadi, R., Taghizedeh, A., Asri-Rezaei, S., Maham, M., Farahmand-Azar, S., & Farhoomand, P. (2011). Garlic: A potential alternative for monensin as a rumen modifier. *Livestock Science*, 142, 276-287.

Benchaar, C. (2021). Diet supplementation with thyme oil and its main component thymol failed to favorably alter rumen fermentation, improve nutrient utilization, or enhance milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104, 324-336.

Benchaar, C., Lettat, A., Hassanat, F., Yang, W. Z., Forster, R. J., Petit, H. V., & Chouinard, P. Y. (2012). Eugenol for dairy cows fed low or high concentrate diets: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, rumen microbial populations and milk fatty acid profile. *Animal Feed Science and Technology*, 178, 139-150.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89, 761-771.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P., Castillejos, L., & Ferret, F. (2007). Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation: a review. *Journal of Dairy Science*, 90, 2580-2595.

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.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., & Ferret, A. (2006). Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *Journal of Dairy Science*, 89, 2649-2658.

Castro Filho, E. S., Júnior, L. C. R., Ezequiel, J. M. B., Salles, M. S. V., Almeida, M. T. C., Perez, H. L., & van Cleef, E. H. C. B. (2021). Effect of thyme essential oil supplementation on feed intake, apparent digestibility, rumen fermentation, blood parameters and in vitro methane yield of Nellore cattle. *Livestock Science*, 244, 104349.

Chaves, A.V., He, M.L., Zang, W.Z., Hristov, A.N., McAllister, T.A., & Benchaar, C. (2008b). Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science*, 88, 117-122.

Chaves, A.V., Stanford, K., Dugan, M. E. R., Gibson, L. L., McAllister, T. A., Van Herk, F., & Benchaar, C. (2008a). Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livestock Science*,117, 215-224.

Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen Methanogens. *Animal*, 7, 253-265.

Fandino, I., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Blanch, M. (2008). Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 409-417.

Fraser, G. R., Chaves, A. V., Wang, Y., McAllister, T. A., Beauchemin, K. A., & Benchaar, C. (2007). Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. *Journal of Dairy Science*, 90, 2315-2328.

Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, L., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.

Jahani-Azizabadi, H., Danesh Mesgaran, M., 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 Microbiology Research*, 5, 4812-4819.

Klieve, A. V., & Hegarty, R. S. (1999). Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50, 1315-1319.

Lin, B., Lu, Y., Salem, A. Z. M., Wang, J. H., & Liang, Q. J. X. (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.

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

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 and Environmental Microbiology*, 69, 5011-5014.

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 and development*, 28, 7-55.

Moss, A. R., Jouany, J. P., & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Review article. *Annales de zootechnie*, 49, 231-253.

Orzuna-Orzuna, G. F., Dorantes-Iturbide, G., Lara-Bueno, A. Miranda-Romero, L. A., Mendoza-Martínez, G. D., & Santiago-Figueroa, I. (2023). Meta-Analysis of Essential Oils Use for Beef Cattle Feed: Rumen Fermentation, Blood Metabolites, Meat Quality, Performance and, Environmental and Economic Impact. *Fermentation*, 8, 254.

Rahmatizadeh, M., Hozhabri, F., & Kafilzadeh, F. (2023). The effect of adding a mixture of peppermint, thyme and rosemary essential oils to diet on growth performance, rumen fermentation parameters and blood metabolites of fattening lambs. *Iranian Journal of Animal Science*, 53(4), 273-285. (In persian).

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and no starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.

Yang, W. Z., Ametaj, B. N., Benchaar, C., & Beauchemin, K. A. (2010a). Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: ruminal and intestinal digestion. *Journal of Animal Science*, 88, 680-688.

Yang, W. Z., Ametaj, B. N., Benchaar, C., & Beauchemin, K. A. (2010b). Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. *Journal of Animal Science*, 88, 1082-1092.