تحقیقات تولیدات دامی
سال سوم/شماره چهارم/زمستان ۱۳۹۳ (۸۸-۷۵)

اثر تیمول به دو شکل آزاد و آهسته‌رهش بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه و متابولیت‌های پلاسما در گوسفند

زهرا زمانی[۱]، داریوش علیپور[۲*]، حمیدرضا مقیمی[۳]، سید علیرضا مرتضوی[۴]، سید مسعود ذوالحواریه[۵]

۱- دانش‌آموخته دوره دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا
۳- استاد گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- استاد گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵- استادیار ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا

(تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۴)

چکیده

این پژوهش به‌منظور مقایسه اثرات تیمول به دو شکل آزاد و آهسته‌رهش بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه، پروتئین میکروبی و برخی متابولیت‌های پلاسما در گوسفند انجام شد. آزمایش در قالب طرح مربع لاتین ۳×۳ به صورت ادغام شده با استفاده از ۶ راس گوسفند نر فیستوله شده انجام شد. تیمارها عبارت بود از (الف) جیره پایه +۲۵۰ میلی‌گرم تیمول به شکل آزاد، (ب) جیره پایه +۲۵۰ میلی‌گرم تیمول به شکل آهسته‌رهش و (ج) تیمار شاهد (جیره پایه بدون تیمول). هر دوره آزمایش ۱۴ روز و شامل ۱۰ روز سازگاری و ۴ روز نمونه‌گیری بود. در دوره نمونه‌گیری، نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شد و در روز پایانی هر دوره نیز نمونه‌های خون و مایع شکمبه در زمان‌های مختلف جمع‌آوری شد. مصرف تیمول به هر دو شکل آزاد و آهسته‌رهش، ماده خشک مصرفی (به ترتیب ۹۱۷/۵ و ۹۸۵/۵ گرم در روز)، قابلیت هضم پروتئین خام (به ترتیب ۸۲/۷ و ۸۵/۶ درصد) و غلظت گلوکز پلاسما (به ترتیب ۱۱۴/۸ و ۱۰۸/۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) را افزایش داد ($P<۰/۰۵$). در تیمارهای محتوی تیمول، غلظت اوره‌ی پلاسما، سنتز پروتئین میکروبی و غلظت نیتروژن آمونیاکی در ۵ و ۷ ساعت پس از خوراکدهی کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). تعداد دیپلودینیوم‌ها در جیره محتوی تیمول آزاد $۰/۳۸\times۱۰^{۵}$ بود که از تعداد مربوط به دو تیمار دیگر کمتر بود ($P<۰/۰۵$). مصرف تیمول می‌تواند با کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی بازده استفاده از پروتئین خوراک را بهبود بخشد و با توجه به افزایش گلوکز پلاسما می‌تواند اثری مثبت در تامین انرژی دام ایجاد کند.

واژه‌های کلیدی: آمونیاک، پروتئین میکروبی، تیمول، گلوکز

* نویسندهٔ مسئول: alipourd@basu.ac.ir

مقدمه

در طی فرآیند تخمیر شکمبه‌ای اتلاف انرژی و پروتئین رخ می‌دهد که بازده خوراک را محدود می‌کند (Budak and Yılmaz, 2013). برای بهینه‌سازی ارزش تغذیه‌ای خوراک، بهبود بازدهی تخمیر و استفاده از سوبسترا، می‌توان در تخمیر شکمبه‌ای تغییراتی ایجاد نمود (McIntosh *et al.*, 2003; Wanapat *et al.*, 2008). از جمله راهکارهایی که در این زمینه اعمال می‌شود استفاده از افزودنی‌های غذایی در جیره است.

افزدنی‌های غذایی به‌طور عمده ترکیبات غیرمغذی هستند که برای بهبود مصرف مواد مغذی خوراک، افزایش عملکرد، کاهش بیماری‌های متابولیکی و حداقل کردن اثرات مضر خوراک در محیط به جیره‌ی دام‌ها اضافه می‌شوند (Adesogan, 2009). محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها (از جمله یونوفرها) در تغذیه‌ی دام، محققان را به مطالعه در زمینه‌ی استفاده از مواد ضدمیکروبی جایگزین سوق داده است. در سال‌های اخیر، گیاهان معطر و روغن‌های استخراج شده از آن‌ها یکی از مهم‌ترین منابع افزودنی‌های غذایی به‌شمار می‌آیند. هدف استفاده از این گونه افزودنی‌ها دستکاری شکمبه برای ایجاد تغییر در فعالیت‌های میکروارگانیسم‌های شکمبه، بهینه‌سازی ارزش تغذیه‌ای خوراک‌ها و بهبود بازدهی تخمیر است (Tekeli *et al.*, 2007).

تیمول یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در برخی اسانس‌ها بوده که اخیراً مورد توجه محققان قرار گرفته است. تیمول (۲- ایزوپروپیل ۵- متیل فنل) یک فنل مونوترپنوئیدی با فرمول مولکولی $C_4H_{10}O$ و ایزومر کارواکرول است. تیمول از روغن فرار آویشن به‌وسیله تقطیر جزء به جزء و سپس تبلور مجدد، تهیه می‌شود. روغن آویشن محتوی ۲۰ تا ۳۰ درصد تیمول است. تیمول به‌طور سنتتیک از پارا-سایمن، منتون، پیپریتون و با واکنش بین متاکروزول با ایزوپروپیل کلراید تهیه می‌شود (Rowe *et al.*, 2009).

یکی از فن‌آوری‌هایی که اخیراً در صنعت تغذیه دام مورد توجه قرار گرفته است استفاده از ترکیبات آهسته رهش است. این فن‌آوری برای ترکیباتی مانند یونوفرها، برخی از اسیدهای آلی، اوره و چربی‌ها بکار برده شده است (Piva *et al.*, 2007). مطالعات انجام شده روی فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها نشان داده است که این ترکیبات سریعاً جذب و متابولیزه می‌شوند (Kohlert *et al.*, 2000). جذب سریع، محدودیت‌هایی را در قابلیت دسترسی فعالیت ضدمیکروبی این ترکیبات ایجاد می‌کند. بنابراین فرضیه این است که با استفاده از محصولات آهسته‌رهش اثرات ضد میکروبی بهبود می‌یابند (Meunier *et al.*, 2006). هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات تیمول به شکل آزاد و آهسته‌رهش بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه، تولید پروتئین میکروبی، متابولیت‌های پلاسما و جمعیت پروتوزوآیی شکمبه بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش طی دو مرحله در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و ایستگاه تحقیقات دامپروری گروه علوم دامی دانشگاه بوعلی‌سینای همدان انجام شد. در مرحله‌ی اول، شکل آهسته‌رهش تیمول با استفاده از ماتریکس پلیمری (شامل اتیل سلولز، هیدروکسی پروپیل متیل سلولز و اروزیل) ساخته شد و روند آزادسازی آن از ماتریکس پلیمری با استفاده از آزمون انحلال بررسی شد (Chaturvedi *et al.*, 2012). پس از بهینه‌سازی فرمولاسیون تیمول، محصول ساخته شده جهت انجام آزمایشات درون تنی مورد استفاده قرار گرفت. آزمایشات درون‌تنی با استفاده از ۶ راس گوسفند نر فیستوله شده از نژاد مهربان (میانگین وزن ۳/۴۷±۳۱ کیلوگرم) در قالب طرح مربع لاتین ۳×۳ به‌صورت ادغام شده با ۳ تکرار انجام شد.

جایگاه نگهداری دام‌ها شامل ۶ جایگاه انفرادی با غذاخوری و آبخوری متحرک و مجزا بود، به‌طوری‌که آب و خوراک به‌راحتی در اختیار دام‌ها قرار گرفت. از یونجه خشک، دانه جو و مکمل معدنی و ویتامینی به‌عنوان اجزاء تشکیل‌دهنده جیره غذایی استفاده شد (جدول ۱). تیمول به دو شکل آزاد و آهسته‌رهش در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در ماده خشک مصرفی از طریق فیستولا در اختیار دام‌ها قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سه تیمار به‌صورت زیر بود: ۱- جیره‌ی بدون تیمول به‌عنوان تیمار شاهد، ۲- جیره‌ی محتوی ۲۵۰ میلی‌گرم تیمول آزاد و ۳- جیره محتوی۲۵۰ میلی‌گرم تیمول آهسته رهش.

جدول ۱- ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی جیره‌ی پایه (بر اساس ۱۰۰ درصد ماده خشک)

Table 1. Ingredients and chemical composition of basal diet

Chemical composition	Alfalfa (60% of diet)	Seed barley (40% of diet)	*Mineral and vitamin supplement (1% of diet)*	Basal diet
DM, %	91.56	93.08	-	92.17
OM, % of DM	92.6	90.5	-	91.76
CP, % of DM	14	10.9	-	12.76
MP, % of DM	10.5	7.25	-	9.48
EE, % of DM	1.5	2.44	-	1.87
NDF, % of DM	46.88	31.28	-	40.64
NFC, % of DM	30.23	45.88	-	36.49
Ash, % of DM	7.4	9.5	-	8.24
ME, (Mcal/kgDM)	2.1	3	-	2.46

DM: Dry matter, OM: Organic matter, CP: Crude protein, MP: Metabolizal protein, EE, Ether extract, NFC= Non structural carbohydrate, NDF= Neutral detergent fiber, ME: Metabolizal energy.

* Mineral and vitamin supplement was prepared from Ammine gostar company, Contained (per kg): 50000 mg of Na; 18000 mg of Zn; 196000 mg of Ca, 96000 mg of P, 2000 mg of Mn; 300 mg of Cu; 3000 mg of Fe; 100 mg of I; and 100 mg of Co, 1 mg of Se, 196000 mg of antioxidant, 500000 IU of vitamin A; 100000 IU of vitamin D, and 100 IU of vitamin E.

هر دوره آزمایش شامل دو بخش عادت پذیری (۱۰روز) و نمونه‌گیری (۴ روز) بود. در طول دوره نمونه‌گیری، باقی‌مانده خوراک جمع‌آوری و توزین شد و نمونه‌برداری از مدفوع نیز انجام شد. در آخرین روز هر دوره، خون‌گیری از ورید وداج گوسفندان به‌وسیله لوله‌های محتوی EDTA در ۲ زمان (قبل از خوراک‌دهی و ۵ ساعت بعد از خوراکدهی) انجام شد. نمونه‌گیری از محتویات شکمبه در ۵ زمان (قبل از خوراک-دهی، ۱، ۳، ۵ و ۷ ساعت بعد از خوراک‌دهی) انجام شد. پس از نمونه‌گیری بلافاصله pH نمونه‌ها قرائت شد. بخشی از نمونه‌ها پس از اسیدی کردن، جهت اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. بخش دیگری نیز به منظور شناسایی شمارش پروتوزوآها با افزودن محلول فرمالین ۵۰ درصد در دمای ۴ درجه نگهداری شد.

به منظور اندازه‌گیری پروتئین میکروبی از محتویات شکمبه مربوط به قبل از خوراکدهی و ۷ ساعت بعد از خوراکدهی استفاده شد. غلظت اوره و گلوکز پلاسما با استفاده از کیت-های تجاری (پارس‌آزمون) به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. ترکیب شیمیایی موجود در خوراک و مدفوع بر اساس روش‌های استاندارد (AOAC, 1990) تعیین شد. قابلیت هضم مواد مغذی با استفاده از مارکر داخلی (خاکستر نامحلول در اسید)، نیتروژن آمونیاکی با استفاده از روش فنل-هیپوکلریت (Broderick, 1980) شناسایی و شمارش پروتوزوآ با استفاده از لام مخصوص (Dehority, 1993) و پروتئین میکروبی به روش اندازه‌گیری ازت پورینی تعیین شد (Makkar and Becker, 2013). بازدهی سنتز پروتئین میکروبی (EMPS) با استفاده از داده‌های حاصل از پروتئین میکروبی و ماده آلی قابل هضم خورده شده محاسبه شد (Bach *et al*., 2005).

صفات مربوط به غلظت گلوکز و اوره‌ی پلاسمای خون، نیتروژن آمونیاکی، pH شکمبه و پروتئین میکروبی به‌صورت اندازه‌های تکرار شده در چارچوب طرح مربع لاتین ادغام شده تجزیه شدند که مدل آماری آن در زیر نشان داده شده است:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + T_j + A_k + Ea_{ij(k)} + B_l + AB_{kl} + Eb_{ij(k)l}$$

Y_{ijk} = مشاهده مربوط به دوره i و حیوان j (از تیمار k) و زمان اندازه‌گیری l، μ = میانگین کلی مشاهده‌ها، R_i= اثر دوره، T_j= اثر تیمار، A_k = اثر حیوان k، $Ea_{ij(k)}$ = اشتباه اصلی، B_l = اثر زمان اندازه‌گیری l، AB_{kl} = برهم‌کنش تیمار k و زمان اندازه‌گیری l، $Eb_{ij(k)l}$ = اشتباه فرعی.

صفات مربوط به قابلیت هضم، ماده خشک مصرفی و تعداد پروتوزوآها به‌صورت مربع لاتین ادغام شده با مدل آماری زیر انجام شد.

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + C_{ik} + T_l + e_{ijk(l)}$$

Y_{ijkl} = مشاهده مربوط به مربع i ام، دوره j ام و حیوان k ام (از تیمار l ام)، μ = میانگین کلی مشاهده‌ها، R_i= اثر

دوره، C_j= اثر حیوان، T_l = اثر تیمار l، $e_{ijk(l)}$ = اشتباه آزمایشی.

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال خطای ۰/۰۵ انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ (SAS, 2004) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به ماده‌ی خشک مصرفی و مقادیر قابلیت هضم مواد مغذی در تیمارهای مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. میزان خوراک مصرفی در تیمار شاهد نسبت به دو تیمار حاوی تیمول به طور معنی‌داری کمتر بود (P<۰/۰۵). مقادیر قابلیت هضم پروتئین خام در دو تیمار محتوی تیمول نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). قابلیت هضم ماده‌ی خشک، ماده‌ی آلی، چربی خام و کربوهیدرات‌های فیبری و غیر فیبری در بین تیمارها تفاوتی نداشتند (P>۰/۰۵).

از عواملی که در مصرف خوراک نشخوارکنندگان موثرند می‌توان به عوامل ژنتیکی، هورمونی، نورواندوکرینی، محیطی و تغذیه‌ای اشاره نمود (Dryden, 2008). عطر ناشی از ترکیبات اسانس می‌تواند اعصاب بویایی و چشایی را تحریک کند که این امر منجر به تحریک اشتها می‌شود. همچنین این ترکیبات با تحریک آنزیم‌های هضمی می‌توانند مصرف خوراک را تحریک کنند (Pulina *et al*., 2013; Perdok *et al*., 2003). از موارد دیگری که مصرف خوراک را تحریک می‌کند جذب ترکیبات محلول خوراک است. ترکیبات اسانس بر جذب مواد مغذی از روده اثر مثبت دارند (Ozdogan *et al*., 2011). با تکیه به موارد فوق شاید بتوان گفت در این پژوهش احتمالاً تیمول توانسته است با اثر بر جذب مواد مغذی در روده مصرف خوراک را افزایش دهد.

جدول ۲- ماده خشک مصرفی (گرم در روز) و قابلیت هضم مواد مغذی (درصد) در تیمارهای مختلف

Table 2. Dry matter intake (g/day) and nutrients digestibility (%) in different treatments.

Parameters*	Treatment**			SEM	*P*-Value
	Free thymol	Slow-release Thymol	Control		
DM Intake g/d	917.5^{b}±209.62	985.5^{a}±115.8	706^{c}±286.83	4.45	0.0020
Digestibility, %					
DM	84.80±1.6	84.50±2.21	82.40±2.41	1.11	0.5231
OM	87.00±1.35	86.00±2	84.15±2.12	0.64	0.4316
CP	82.70^{a}±2.01	85.60^{a}±2.74	80.90^{b}±3.19	0.23	0.0168
EE	59.20±1.26	59.40±0.92	59.60±0.73	0.27	0.3575
NDF	83.60±2.05	84.98±1.81	78.50±4.53	0.51	0.0757
NFC	96.02±0.07	96.17±0.36	96.13±0.12	0.08	0.9448

*DM: Dry matter, OM: Organic matter, CP: Crude protein, EE, Ether extract, NFC= Non structural carbohydrate, NDF= Neutral detergent fiber

**∗Treatments were control (without thymol), 250 mg/kgDMI of free thymol, 250 mg /kgDMI of Slow-release thymol.

a,b,cMeans within columns with different superscripts differ (P < 0.05).

بسته به نوع و مقدار مصرف اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها، گزارشات مختلفی از اثرات آن‌ها بر خوراک مصرفی در دسترس است. نتایج تحقیقات مختلف نشان داد که تغذیه‌ی ۲۵۰ میلی‌گرم در روز اسانس پونه‌ی کوهی در گوسفند (Wang *et al*., 2000)، ۲ گرم در روز جوانه‌ی سرو کوهی محتوی ۳۵ درصد α-پینین در گاو (Yang *et al*., 2007) و ۰/۷۵ گرم مخلوط اسانس در گاوهای شیرده (Benchaar *et al*., 2006; 2007) اثری بر خوراک مصرفی نداشته است، اما تغذیه‌ی سینامالدئید (۱۸۰ میلی‌گرم در روز) و اوژنول (۹۰ میلی‌گرم در روز) در گاوهای شیرده (Cardozo *et al*.,

2006) خوراک مصرفی را کاهش داده است. مقدار مصرف اسانس مهم است به این دلیل که در برخی گزارش‌ها مقادیر پایین، مصرف خوراک را تحریک و مقادیر بالا بر مصرف خوراک اثر معکوس داشته است (Patra, 2011).

اثرات اسانس بر تجزیه‌ی پروتئین در شرایط *in situ* مطالعه شده است که نتایج آن در مطالعات مختلف متفاوت است. در پژوهشی اثرات تغذیه‌ی مخلوطی از اسانس (تیمول، لیمونن، اوژنول و وانیلین) در گاوهای شیرده روی تجزیه‌ی پروتئین (کنجاله‌ی سویا) و فیبر (سیلاژ علوفه) در شرایط *in situ* بررسی شده است و اثری در تجزیه‌ی این خوراک‌ها مشاهده نشده است، دلیل آن کاهش اثرات اسانس‌های استفاده شده روی تعداد باکتری‌های سلولیتیک و آمیلولیتیک در آزمایش بیان شده است (Benchaar *et al*., 2006). در پژوهش دیگری از تلیسه‌های در حال رشد برای برآورد اثرات مخلوطی از اسانس‌ها (تیمول، لیمونن، اوژنول و وانیلین به مقدار ۷۰۰ میلی‌گرم در روز به ازای هر دام) بر تجزیه شکمبه‌ای پروتئین‌های کنجاله‌ی سویا، گلوتن ذرت، پودر ماهی، نخود سبز و کنجاله‌ی آفتابگردان در شرایط *in situ* استفاده شد و گزارش شد که با مصرف اسانس، تجزیه‌ی شکمبه‌ای نخود سبز و کنجاله‌ی سویا تمایل به کاهش نشان داد. همچنین اسانس اثر کاهشی بسیار اندکی بر تجزیه‌ی شکمبه‌ای پروتئین داشت (Molero *et al*., 2004). بر اساس این نتایج، محققان بیان کردند به نظر می‌رسد اثر اسانس بر تجزیه‌ی شکمبه‌ای پروتئین انتخابی است چون فقط گونه‌های خاص باکتریایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Hart *et al*., 2007). در مطالعه حاضر، احتمالاً بهبود قابلیت هضم پروتئین خام در تیمارهای محتوی تیمول می‌تواند ناشی از هضم و جذب بیشتر نوع خاصی از پروتئین‌ها باشد که در نهایت منجر به افزایش قابلیت هضم پروتئین شده است. شکمبه محل اصلی هضم ماده‌ی خشک و فیبر خوراک است. بنابراین هضم شکمبه‌ای ماده‌ی خشک و فیبر یکی از مهم‌ترین نشانه‌های ارزیابی اثرات اسانس‌ها بر قابلیت هضم شکمبه‌ای خوراک هستند (Busquet *et al*., 2006; Lin *et al*., 2009).

محققان مخلوطی از اسانس‌ها (دارچین، میخک، پونه کوهی و لیمو) را با استفاده از سدیم آلژینات پوشش دادند و آن‌ها را در سطح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در روز به گوسفندان تغذیه نمودند و مشاهده کردند که مصرف اسانس با پوشش سدیم آلژینات اثری بر قابلیت هضم ماده‌ی خشک نداشت، اما قابلیت هضم پروتئین خام را کاهش داد (Lin *et al*., 2013). در مطالعه‌ی دیگر پژوهشگران دریافتند با مصرف ۸۷ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده‌ی خشک سینامالدئید در گاوهای هلشتاین، قابلیت هضم مواد مغذی افزایش یافت. (Benchaar *et al*., 2006). این محققان گزارش کردند که اثرات اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها بر هضم فیبر و نشاسته احتمالاً به دوز مصرفی آن‌ها بستگی دارد.

در جدول ۳ پروتوزوآهای شناسایی شده همراه با تعداد آنها نشان داده شده است. پروتوزوآهای شناسایی شده در محتویات شکمبه شامل *انتودینیوم کوداتوم*- فرم دوباردی[1]، *انتودینیوم کوداتوم* فرم *کوداتوم ابسواسپیرانوم*، دیپلودینیوم[2]، افریواسکولکس[3] و ایزوتریشا[4] بود. جنس غالب در همه‌ی تیمارها انتودینیوم کوداتوم- فرم دوباردی بود. جمعیت انتودینیوم، ایزوتریشا و افریواسکولکس بین تیمارها تفاوتی نداشت اما تعداد دیپلودینیوم‌ها در تیمار حاوی تیمول آزاد به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار آهسته‌رهش و تیمار شاهد کمتر بود ($P<۰/۰۵$). تعداد کل پروتوزوآها بین تیمارها تفاوتی نداشت ($P>۰/۰۵$). پروتوزوآها نقش منفی در مصرف نیتروژن به‌وسیله نشخوارکنندگان دارند. پروتوزوآها تعداد زیادی از باکتری‌های شکمبه را بلعیده و هضم می‌کنند، بنابراین جریان پروتئین میکروبی را از شکمبه به دئودنوم کاهش می‌دهند (Benchaar *et al*., 2008). اثرات عصاره‌های گیاهی نظیر تانن‌ها و ساپونین‌های استروئیدی بر پروتوزوآهای مژکدار شکمبه به‌طور وسیعی بررسی شده‌اند (Wallace, 2004; Wang *et al*., 1996; Wang *et al*., 2000; Min *et al*., 2002)، اما مطالعات کمی درباره‌ی اثرات اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها بر پروتوزوآها موجود است. در مطالعه‌ای، محققان با تغذیه‌ی ۲۰۰ گرم در روز گیاه نعناع به گوساله‌های هولشتاین کاهش تعداد کل پروتوزوآها و

1. *Entodinium caudatum*
2. *Diplodinium*
3. *Ophryoscolex*
4. *Isotrisha*

همچنین کاهش تعداد انتودینیوم، ایزوتریشا و دیپلودینیوم را مشاهده کردند (Ando *et al*., 2003).

گزارش شده است که استفاده از اسانس آویشن شیرازی جمعیت انتودینوم‌ها را کاهش داده است (Talebzadeh *et al*., 2012). در مطالعه‌ای دیگر نیز افزایش تعداد پروتوزوآها تحت تاثیر اسانس نعناع و پونه‌ی کوهی در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است (Patra *et al*., 2012). به طورکلی اسانس‌ها و ترکیبات موجود در آن‌ها اثر چشمگیری بر تعداد یا فعالیت پروتوزوآهای مژکدار شکمبه‌ای ندارند.

جدول ۳- تعداد کل و توزیع جنس‌های پروتوزوآهای مژکدار شکمبه‌ای در تیمارهای مختلف ($\times 10^5$ در هر میلی‌لیتر)

Table 3. Total numbers and distribution by genera of ruminal ciliate protozoa in different treatments. ($\times 10^5$/ml)

Protozoa	Treatment*			SEM	*P*-Value
	Free thymol	Slow-release thymol	Control		
Entodinium caudatum	2.26±1.04	2.98±0.68	2.24±0.82	o.34	0.3417
Entodinium caudatum- caudatum obosuspiranum	0.027±0.04	0.022±0.01	0.072±0.01	0.008	0.0933
Diplodinium spp	0.38^b±0.02	1.4^a±0.02	1.13^a±0.01	0.006	0.0305
Ophryoscolex spp	0.83±0.03	0.88±0.05	1.08±0.03	0.01	0.6237
Isotricha spp.	0.33±0.01	0.25±0.06	0.39±0.03	0.003	0.0717
Total	2.44±0.96	3.22±0.64	2.54±0.81	2.74	0.3286

*Treatments were control (without thymol), 250 mg/kgDMI of free thymol, 250 mg /kgDMI of Slow-release thymol.
[a,b,c]Means within columns with different superscripts differ ($P < 0.05$).

نتایج مربوط به نیتروژن آمونیاکی در ساعت‌های مختلف در جدول ۴ ارائه شده است. از زمان قبل از خوراک‌دهی تا ساعت سوم بعد از خوراک‌دهی، غلظت آمونیاک بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار نداشت. در ساعت پنجم و هفتم پس از خوراک‌دهی مقدار آمونیاک در تیمارهای محتوی تیمول نسبت به تیمار شاهد کمتر شد.

جدول ۴- مقایسه میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در ساعت‌های مختلف در تیمارهای آزمایش (میلی‌مول بر لیتر)

Table 4. Comparison of means of rumen ammonia nitrogen concentration in different times of experimental treatments (Mm/L).

Tratments*	Before feeding	After feeding (hour)			
		1	3	5	7
Free thymol	6±0.81	6.8±0.45	5.1±0.98	2.9^b±0.46	4.1^b±1.36
Slow-release thymol	5.3±0.14	6.3±0.89	4.9±0.72	3.7^b±0.83	3.4^b±1.27
control	6.3±0.77	7.9±0.67	6.2±0.42	7^a±1.2	5.7^a±0.28
SEM	0.24	0.35	0.44	0.48	0.15
P-Value	0.2702	0.4723	0.5664	0.022	0.0146

*Treatments were control (without thymol), 250 mg/kgDMI of free thymol, 250 mg /kgDMI of Slow-release thymol.
[a,b]Means within rows with different superscripts differ ($P < 0.05$).

در زمینه‌ی اثرات اسانس و ترکیبات آن‌ها بر متابولیسم شکمبه‌ای نیتروژن پژوهش‌هایی انجام شده است. اولین مطالعه در این زمینه نشان داد که افزودن تیمول به مایع شکمبه‌ی محتوی کازئین (به میزان یک گرم در لیتر) منجر به تجمع اسیدهای آمینه و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شد (Borchers, 1965)، که دلیل آن مهار آمین‌زدایی اسید-آمینه ذکر شد. پژوهشگران دریافتند که تغذیه‌ی مخلوط اسانس‌ها (تیمول، اوژنول، لیمونن و وانیلین) رشد باکتری-های تولیدکننده‌ی آمونیاک بالا[1] (HAP) از قبیل *کلستریدیوم استیکلاندی* و *پپتوستریپتوکوکوس آناروبیوس* را

1 .Hyper-ammonia-producing bacterium (HAP)

مهار نمود (McIntosh *et al*., 2003)، در حالی که *کلستریدیوم آمینوفیلوس* حساسیت کمتری داشت. تعداد باکتری‌های تولیدکننده‌ی آمونیاک بالا کمتر از یک درصد تعداد کل باکتری‌های شکمبه است، اما با این وجود این باکتری‌ها فعالیت آمین‌زدایی بسیار بالایی دارند. در یک پژوهش، محققان اثر اسانس آویشن شیرازی که غنی از تیمول و کارواکرول بود را بر یک باکتریHAP به نام *کلستریدیوم بای‌فرمنتنس* بررسی نمودند. این پژوهشگران دریافتند که رشد باکتری و تولید آمونیاک در حضور اسانس کمتر شد (Taghavi-Nezhad *et al*., 2014). از نتایج مطالعات انجام شده فوق‌الذکر برداشت می‌شود که اثرات اسانس‌ها و ترکیبات موجود در آن‌ها بر متابولیسم شکمبه‌ای پروتئین مهار آمین‌زدایی اسیدهای آمینه است و این اثرات بیشتر به دلیل مهار باکتری‌های تولیدکننده‌ی آمونیاک بالا می‌باشد.

در جدول ۵ میزان نیتروژن میکروبی تولید شده و بازدهی سنتز پروتئین میکروبی در تیمارهای مختلف قبل از خوراکدهی و ۷ ساعت بعد از خوراکدهی نشان داده شده است. نیتروژن میکروبی تولید شده قبل از خوراکدهی در تیمار آهسته‌رهش نسبت به دو تیمار دیگر کمتر بود (P<۰/۰۵) در حالی که ۷ ساعت بعد از خوراکدهی تفاوتی بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بازدهی سنتز پروتئین میکروبی قبل از خوراکدهی و ۷ ساعت بعد از خوراکدهی بین تیمارها تفاوتی نداشت. کاهش نیتروژن میکروبی در تیمارهای محتوی تیمول می‌تواند نتیجه مهار رشد برخی گونه‌های باکتریایی تحت تاثیر تیمول باشد. محققان با مطالعه‌ی اثر تیمول و ایزومر آن یعنی کارواکرول بر اشریشیاکولی در شرایط آزمایشگاهی مشاهده کردند که ذخیره‌ی ATP داخل سلولی کاهش و ATP خارج سلولی افزایش یافت (Helander *et al*., 1998). باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساس‌ترند که دلیل آن ساختار غشایی آنهاست. در باکتری‌های گرم منفی لایه‌ی خارجی غشاء به گونه‌ای است که دسترسی ترکیبات هیدروفوب به داخل سلول را مهار می‌کند (Burt, 2004). برخی پژوهشگران بیان کردند که اسانس‌ها می‌توانند کلونیزاسیون باکتری‌های آمیلولیتیک و پروتئولیتیک را کاهش دهند بدون اینکه بر هضم فیبر اثر منفی داشته باشند (Wallace *et al*., 2002)، اما عده‌ای نیز گزارش کردند که فعالیت زایلاناز و کربوکسی متیل سلولاز در حضور عصاره-های میخک و رازیانه کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده‌ی کاهش جمعیت باکتریایی تولیدکننده‌ی این آنزیم‌ها می‌باشد (Patra and Saxena, 2010).

پژوهشگران در گزارشی بیان کردند که تیمول از دو طریق متابولیسم انرژی را تحت تاثیر قرار می‌دهند: (۱) مهار رشد *استرپتوکوکوس بوویس* و (۲) مهار رشد *سلنوموناس رومینانتیوم* که منجر به کاهش غلظت متان و لاکتات می-شود (Evans and Martin, 2000). این محققان گزارش کردند که غلظت‌های بالای تیمول متابولیسم میکروبی را مهار می‌کند. این مکانیسم از طریق نفوذ تیمول به غشای سلولی و کاهش جذب گلوکز به‌وسیله سلول است. یکی از اهداف تغذیه‌ی مناسب شکمبه حداکثر کردن پروتئین قابل تجزیه به‌صورت افزایش پروتئین میکروبی می‌باشد (Bach *et al*., 2005). افزایش پروتئین میکروبی نه تنها کاربرد اسیدهای آمینه در روده‌ی باریک را بهبود می‌بخشد بلکه اتلاف نیتروژن را نیز کاهش می‌دهد (Bach *et al*., 2005).

مهم‌ترین ارزیابی بازدهی رشد میکروبی تعیین گرم نیتروژن میکروبی به ازای هر واحد انرژی قابل دسترس شکمبه است (معمولاً بر اساس ماده‌ی آلی یا کربوهیدرات تخمیر شده‌ی واقعی بیان می‌شود). این تعبیر این‌گونه توجیه شده است که انرژی مهم‌ترین عامل محدودکننده‌ی رشد میکروبی می‌باشد. بنابراین به حداکثر رسیدن مقدار پروتئین میکروبی به ازای ماده‌ی آلی تخمیر شده نشان‌دهنده افزایش رشد میکروبی است (Bach *et al*., 2005).

جدول ۵- اثر اشکال مختلف تیمول بر نیتروژن میکروبی تولید شده و بازدهی سنتز پروتئین میکروبی

Table 5. Effect of different forms of thymol on Microbial nitrogen produced and efficiency of microbial protein synthesis

Treatments	Microbial nitrogen (g)		microbial protein synthesis (g/kg DOMI*)	
	Before feeding	7 hours after feeding	Before feeding	7 hours after feeding
Free thymol	14.19[a]±0.06	33.8±3.5	11.33±0.4	27±2.8
Slow-release thymol	8.2[b]±3.5	34.7±5	6.97±3	29.4±4.3
control	15.7[a]±3.8	35.7±3.4	7.9±1.9	18±1.7
SEM	0.82	1.7	0.60	1.23
P-Value	0.0359	0.5361	0.0554	0.0847

*DOMI: Digestible organic matter intake

**Treatments were control (without thymol), 250 mg/kgDMI of free thymol, 250 mg /kgDMI of Slow-release thymol.

[a,b]Means within rows with different superscripts differ ($P < 0.05$).

در پژوهش حاضر، بازدهی سنتز پروتئین میکروبی قبل از خوراکدهی تمایل به معنی‌دار شدن داشت (*P*=۰/۰۵۵۴) و از لحاظ عددی در تیمارهای آهسته‌رهش و شاهد نسبت به تیمار محتوی تیمول آزاد کمتر بود. بازدهی در ۷ ساعت بعد از خوراکدهی در تیمارهای تیمول آزاد و آهسته‌رهش از لحاظ عددی نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود. از آنجایی که بازدهی سنتز پروتئین میکروبی با محاسبه‌ی ماده‌ی آلی خورده شده به‌دست می‌آید، می‌توان گفت تغییرات مشاهده شده ناشی از تفاوت در ماده‌ی آلی خورده شده در تیمارها می‌باشد. بازدهی سنتز پروتئین میکروبی شاخص مناسبی از مقدار انرژی است که در مسیر ذخیره‌ی انرژی در میکروب‌ها قرار گرفته است (Bach *et al*., 2005).

نتایج مربوط به غلظت اوره و گلوکز پلاسما در جدول ۶ ارائه شده است. اوره‌ی پلاسما قبل از خوراکدهی در تیمار شاهد بیشترین مقدار بود (*P*<۰/۰۵). ۵ ساعت بعد از خوراکدهی اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (*P*=۰/۰۷۵۹). گلوکز پلاسما قبل از خوراکدهی تفاوتی بین تیمارها نداشت (*P*>۰/۰۵)، اما مقدار آن ۵ ساعت بعد از خوراکدهی در جیره‌های محتوی تیمول آزاد و آهسته‌رهش نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود (*P*<۰/۰۵). از دلایلی که به موجب آن اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها گلوکز خون را افزایش می‌دهند این است که اسانس‌ها احتمالاً ضخامت دیواره‌ی روده را به واسطه‌ی کاهش میکروفلور نامطلوب کاهش می‌دهند و جذب مواد مغذی را بهبود می‌بخشند که افزایش گلوکز پلاسما نیز می‌تواند ناشی از بهبود جذب آن از روده باشد (Bampidis *et al*., 2005; Jamroz *et al*., 2006). محققان گزارش کردند که افزودن سینامالدئید در جیره‌ی گاوهای پرواری تغییر اندکی در سطح گلوکز خون ایجاد کرد. سطوح گلوکز پلاسما در پژوهش این محققان ۱۱۱ تا ۱۳۱ میلی‌گرم در دسی‌لیتر گزارش شد (Yang *et al*., 2010). پژوهشگران افزایش گلوکز پلاسما را در گوساله‌های هلشتاین هنگام تغذیه‌ی مخلوط اسانس (اکالیپتوس، منتول و نعناع) در سطح ۲۸۱ میلی‌گرم در روز مشاهده کردند (Soltan, 2009).

جدول ۶- اثر اشکال مختلف تیمول بر غلظت پلاسمایی اوره و گلوکز در زمان‌های مختلف (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)

Table 6. Effect of different forms of thymol on plasma urea and glucose concentration in different times (mg/dl)

Treatments*	Plasma urea		Plasma glucose	
	Before feeding	5 hours after feeding	Before feeding	5 hours after feeding
Free thymol	21.7^{b}±2.7	23.1±3.9	84.7±11.9	114.8^{a}±18.4
Slow-release Thymol	26.8^{b}±1.1	21.9±1.6	86.6±11.6	108.5^{a}±8.7
control	33.3^{a}±7.02	26.9±4.4	91.6±2.8	79.5^{b}±9.3
SEM	0.77	0.6	3.7	2.3
P-Value	0.0226	0.0759	0.0509	0.0084

*Treatments were control (without thymol), 250 mg/kgDMI of free thymol, 250 mg /kgDMI of Slow-release thymol.

[a,b]Means within rows with different superscripts differ ($P < 0.05$).

در مقابل، برخی پژوهشگران گزارش دادند که افزودن مخلوط اسانس (آویشن، رازیانه، چایی و پرتقال) به جیره به میزان ۱ گرم در روز تفاوتی در سطح گلوکز پلاسما ایجاد نکرد (Ozdogan *et al*., 2011). در پژوهشی محققان با بررسی روی بزهای شیرده دریافتند که تغذیه‌ی اسانس سیر، گلوکز خون را از ۶۵ به ۶۸ میلی‌گرم در دسی‌لیتر افزایش داد (Kholif *et al*., 2012). این محققان افزایش گلوکز خون را ناشی از افزایش پروپیونات در شکمبه عنوان کردند. در مطالعه‌ای نیز هنگام تغذیه‌ی کارواکرول (ایزومر تیمول) به گوساله‌های پرواری اثر معنی‌داری در گلوکز پلاسما مشاهده نشد (Castillo *et al*., 2012).

از عوامل شکمبه‌ای که چرخه‌ی اوره‌ی خون را تحت تاثیر قرار می‌دهد غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه می‌باشد که اثری مستقیم بر انتقال نیتروژن اوره‌ای دارد. این اثر در شکمبه به‌وسیله افزایش نفوذپذیری اپیتلیوم شکمبه به نیتروژن اوره‌ای اعمال می‌شود.. اگر غلظت آمونیاک در شکمبه بالا باشد نمی‌تواند مورد استفاده میکروب‌های شکمبه قرار گیرد، ازاین رو از دیواره شکمبه جذب خون شده و در کبد به اوره تبدیل شده و سبب افزایش اوره پلاسما می‌شود (Mathis *et al*., 2003). عوامل دیگری نیز در تعیین غلظت اوره‌ی خون موثر هستند، از جمله‌ی این عوامل می‌توان به زمان جمع‌آوری نمونه، وزن حیوان، روش اندازه‌گیری اوره‌ی خون و نژاد اشاره کرد (Tshuma, 2013).

اطلاعات اندکی درباره‌ی اثرات ترکیبات اسانس در شرایط درون‌تنی وجود دارد، به‌ویژه اطلاعات درباره اثرات این ترکیبات بر پارامترهای خونی بسیار اندک است. محققان با بررسی اثر مخلوط اسانس (آویشن، رازیانه، چایی و پرتقال) در بره‌های پرواری کاهش معنی‌دار اوره‌ی پلاسما را مشاهده کردند (Ozdogan *et al*., 2011). سطح اوره‌ی خون در پژوهش آن‌ها ۲۸/۲ تا ۴۰/۸ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. در پژوهش حاضر با توجه به کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در جیره‌های محتوی تیمول، غلظت اوره‌ی پلاسما نیز به دلیل کاهش جذب آمونیاک از دیواره‌ی شکمبه کاهش یافته است.

در جدول ۷ مقدار pH شکمبه در زمان‌های مختلف نشان داده شده است. در هیچ یک از زمان‌ها، تفاوت آماری از نظر میزان pH شکمبه مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در بسیاری از ویژگی‌های تخمیر شکمبه‌ای این مطلب اهمیت دارد که pH شکمبه کاهش نیابد زیرا می‌تواند منجر به شرایط حساس مثل اسیدوز شکمبه‌ای شود. پژوهشگران با تغذیه‌ی ۱ گرم در روز سینامالدئید به گاوهای شیری تفاوتی در pH شکمبه‌ای مشاهده نکردند (Benchaar *et al*., 2005). در یک بررسی در گاوهای شیرده هلشتاین مشخص شد که مصرف ۵ گرم در روز حبه سیر و ۲ گرم در روز دانه‌ی سرو کوهی تغییری در pH شکمبه ایجاد نکرد (Yang *et al*., 2007). عدم تغییر pH تحت تاثیر ترکیبات اسانس در گزارشات دیگر نیز بیان شده است. اسانس‌های مورد استفاده در این پژوهش‌ها ۲ گرم در روز اسانس بادیان رومی، ۱ گرم در روز اسانس فلفل و مخلوطی از سینامالدئید (۰/۶ گرم در روز) و اوژنول (۰/۳ گرم در روز) بوده است (Cardozo *et al*., 2006).

محققان گزارش کرده‌اند که تیمول در pH برابر با ۵/۵ نسبت به pH برابر با ۶/۵ فعالیت ضدمیکروبی قوی‌تری دارد. بهبود فعالیت ترکیبات اسانس در pH پایین‌تر احتمالاً به دلیل

داشتن گروه هیدروکسیل و خاصیت هیدروفوبی آن‌ها بوده که باعث می‌شود راحت‌تر به لایه‌ی لیپیدی غشای سلول نفوذ کند و اثر ضد میکروبی خود را اعمال نماید (Burt, 2004). طبق گزارشات محققان ترکیبات موجود در اسانس که اکسیژن بیشتری دارند (به ویژه تیمول) علی‌رغم اینکه اثر ضد میکروبی بیشتری دارند، سریعتر به‌وسیله باکتری‌ها تجزیه می‌شوند، از این رو هنگامی که تیمول به یکباره در اختیار دام قرار می‌گیرد همه آن در معرض تجزیه قرار می‌گیرد، اما اگر به تدریج در اختیار دام گیرد اثرات آن بیشتر آشکار می‌شود.

در تیمول آهسته رهش در هر ساعت درصدی از تیمول آزاد و در اختیار دام قرار می‌گیرد. در پژوهش حاضر احتمال دارد مقدار تیمول آزاد شده در هر ساعت برای مشاهده‌ی اثرات آن کافی نباشد. این امر نشان می‌دهد که ترکیب آهسته-رهش تیمول احتیاج به بهینه‌سازی بیشتری دارند که مدت - زمان بیشتری را در این جهت می‌طلبد.

جدول ۷- اثر اشکال مختلف تیمول بر pH شکمبه در زمان‌های مختلف.

Table 7. Effect of different forms of thymol on rumial pH at different times.

Treatments*	Before feeding	After feeding (hour)			
		1	3	5	7
Free thymol	7±0.17	6.1±0.33	5.7±0.52	5.6±0.83	5.5±0.62
Slow-release Thymol	6.8±0.25	6.1±0.07	5.7±0.1	5.4±0.28	5.5±0.17
control	6.7±0.16	6.1±0.2	5.9±0.33	5.9±0.38	5.7±0.26
SEM	0.05	0.05	0.03	0.1	0.12
P-Value	0.7016	0.5994	0.8218	0.3851	0.5522

*Treatments were control (without thymol), 250 mg/kgDMI of free thymol, 250 mg /kgDMI of Slow-release thymol.

[a,b]Means within rows with different superscripts differ ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که افزایش ماده‌ی خشک مصرفی، کاهش آمین‌زدایی اسیدهای آمینه و به دنبال آن کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی در شکمبه از اهداف راهبردی در تغذیه‌ی نشخوارکنندگان است، اهمیت این موضوع در این آزمایش به خوبی در جیره‌های محتوی تیمول چه به‌صورت آزاد و چه به‌صورت آهسته‌رهش مشاهده می‌شود. افزایش غلظت گلوکز پلاسما ۷ ساعت بعد از خوراکدهی نشان می‌دهد در دام‌هایی که تیمول دریافت نموده‌اند احتمالاً پروپیونات بیشتری در شکمبه تولید شده و در نتیجه، فرآیند گلوکونئوژنز از پیش-ساز آن یعنی پروپیونات با بازدهی مطلوب‌تری صورت گرفته است.

سپاسگزاری

از پرسنل محترم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به ویژه آزمایشگاه سامانه‌های دارورسانی، همچنین جناب آقای دکتر مصطفی صفاری که نقش مهمی در انجام این پژوهش ایفا نمودند صمیمانه سپاسگزاری می-گردد.

فهرست منابع

Adesogan A.T. 2009. Using Dietary Additives to Manipulate Rumen Fermentation and Improve Nutrient Utilization and Animal Performance. dairy.ifas.ufl.edu. Florida ruminant nutrition symposium, 20th symposiu. 13-38.

Ando T., Nishida T., Ishhida M., Hosoda K and Bayaru E. 2003. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. Livestock Production Science, 82: 245-248.

AOAC. 1990. "Official methods of analysis" 15th edition. Association of official analytical chemist, Arlington, U.S.A.

Bach A., Calsamiglia S. and Stern M. D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science, 88: 9–21.

Bampidis V. A., Christodoulou V., Christaki E., Florou-Paneri P. and Spais A. B. 2005. Effect of dietary garlic bulb and garlic husk supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. Animal Feed Science and Technology, 121: 273-283.

Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A. V., Fraser G. R., Colombatto D., McAllister T. A. and Beauchemin K. A. 2008. A review of plant-derived essential oils in in ruminant nutrition and production. Animal Feed Science and Technology, 145: 209–228.

Benchaar C., McAllister T. A. and Chouinard P. Y. 2005. Effects of cinnamaldehyde, yucca saponins extract and condensed tannins on fermentation characteristics, and ciliate protozoal populations in the rumen of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 83 (Suppl. 1): 304.

Benchaar C., Petit H. V., Berthiaume R., Ouellet D. R., Chiquette J. and Chouinard P. Y. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. Journal of Dairy Science, 90: 886–897.

Benchaar C., Petit H. V., Berthiaume R., Whyte T. D. and Chouinard P. Y. 2006. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. Journal of Dairy Science, 89: 4352–4364.

Borchers R. 1965. Proteolytic activity of rumen fluid *in vitro*. Journal of Animal Science, 24: 1033–1038.

Broderick G. A. and 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.

Budak D., Yılmaz A .2013. Effects of aromatic plants on rumen fermentation. Macedonian . Journal of Animal Science. 3(1): 75–80.

Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.

Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A. and Kamel C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science, 89: 761–771.

Cardozo P. W., Calsamiglia S., Ferret A. and 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 Dairy Science, 84: 2801–2808.

Castillo C., Benedito J. L., Vazquez P., Pereira V., Mendez J., Juan Sotillo J. and Hernandez J. 2012. Effects of supplementation with plant extract product containing carvacrol, cinnamaldehyde and capsaicin on serum metabolites and enzymes during the finishing phase of feedlot-fed bull calves. Animal Feed Science and Technology, 171: 246– 250.

Chaturvedi S., Sharma P. K, Visht S. and Tyagi S. 2012. "Comparison of emulsification and ionic gelation method of preparation of mucoadhesive microsphere". The Pharma Innovation**,** 1: 1-10.

Dehority B. A. 1993. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. CRC press, Inc, Boca Raton. FL.

Dryden G. M. 2008. Animal nutrition science**,** CABI, 302 pages.

Evans J. D. and Martin S. A. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. Curr. Microbiol. 41:336–340.

Hart K.J., Yanez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEwan N.R and Newbold C.J. 2007. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology, 1-28

Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol L., Smid E. J., Gorris L. G. M. and 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.

Jamroz D., Wertelecki T., Houszka M. and Kamel C. 2006. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 90: 255–268.

Kholif S. M., Morsy T. A., Abdo M. M., Matloup O. H and Abu El-Ella A. A. 2012. Effect of supplementing lactating goats rations with garlic, cinnamon or ginger oils on milk yield, milk composition and milk fatty acids profile. Journal of Life Sciences, 4(1): 27-34.

Kohlert C., Van Rensen I., Marz R., Schindler G., Graefe E. U. and Veit M. 2000. "Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans". Planta Medica**,** 66: 495–505.

Lin B., Lu Y., Salem A. Z. M., Wang J. H., Liang Q. and Liu 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.

Lin B., Tan Z., Xiao G., Wang M., Cong Z., Wang S., Tang S., Zhou C., Sun Z. and Wang W. 2009. Evaluation of compositional and nutritional equivalence of genetically modified rice to conventional rice using in situ and in vitro techniques. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 1490–1497.

Makkar H. P. S. and Becker K. 1999. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. British Journal of Nutrition, 81: 107-113.

Mathis C. P. and Sawyer J. E. 2003. Urea in range cattle supplements. New Mexico state university. Cooperative extension service. Circular 583 college of agriculture and home economics.

McIntosh F. M., Williams P., Losa R., Wallace R. J., Beever D. A. and Newbold C. J. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. Applied and Environmental Microbiology, 69: 5011–5014.

Meunier J. P., Cardot J. M., Gauthier P., Beyssac E. and Alric M. 2006. "Use of rotary fluidized-bed technology for development of sustained-release plant extracts pellets: Potential application for feed additive delivery". Journal of Animal Science, 84: 1850-1859.

Min B. R., Barry T. N., Attwood G. T. and McNabb W. C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperature forages: A review. Animal Feed Science and Technology, 106: 3–19.

Molero R., Ibars M., Calsamiglia S., Ferret A. and Losa R. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. Animal Feed Science and Technology, 114: 91–104.

Ozdogan M., Onenc S. S and Onenc A. 2011. Fattening performance, blood parameters and slaughter traits of Karya lambs consuming blend of essential oil compounds. African Journal of Biotechnology, 10(34): 6663-6669.

Patra A. K. 2011. Effect of essential oil on rumen fermentation, microbial ecology and ruminal production. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 6(5): 416-428.

Patra A. K. and Saxena J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry, 71: 1198–1222.

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

Perdok H., Langhout P. and Vugt P. V. 2003. Stimulating appetite. Feed mixture, 11: 10-13.

Piva A., Pizzamigli V., Morlacchini M., Tedeschi M. and Piva G. 2007. Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along swine intestine. Journal of Animal Science, 85: 486-493.

Pulina G Avondo M., Molle G., Francesconi A. H. D., Atzori A. S. and Cannas A. 2013**.** Invited Review: Models for estimating feed intake in small ruminants. Brasileira de Zootecnia, 42(9): 675-690.

Rowe R. C., Sheskey P. J. and Quinn M. E. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth edition. RPS Publishing. UK. ruminant nutrition and production. Animal Feed Science and Technology, 145: 209–228.

SAS. 2004. SAS/STAT software: changes and enhancements though release. 9.1 Statistical Analysis System Institute, Cary, NC.

Soltan M. A. E., Shewita R. S. and Al-Sultan S. I. 2009. Influence of essential oils supplementation on digestion, rumen fermentation, rumen microbial populations and productive performance of dairy cows. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 3: 1–12.

Taghavi-Nezhad A. M., Alipour D., Flythe M. D., Zamani P. and Khodakaramian G. 2014. 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.

Talebzadeh R., Alipour D., Saharkhiz M. J., Azarfar A. and Malecky M. 2012. Effect of essential oils of *Zataria multiflora* on *in vitro* rumen fermentation, protozoa population, growth and enzyme activity of anaerobic fungus isolated from Mehraban sheep. Animal Feed Science and Technology, 172: 115–124.

Tekeli A., Çelik L. and Kutlu H. R. 2007. Plant extracts; a new rumen moderator in ruminant diets. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty, 4 (1).

Tshuma T. 2013. The effect of blood urea nitrogen on reproductive performance of beef heifers on different levels of nitrogen supplementation. PhD thesis. Faculty of Veterinary Science, Universiy of Pretoria. Africa.

Wallace R. J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proceedings of Nutrition Society, 63: 621–629.

Wallace R. J., McEwan N. R., McIntosh F. M., Teferedegn B. and. Newbold C. J. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 10: 1458–1468.

Wanapat M., Pichad K., Pawadee P. and Sadudee W. 2008 Effect of supplementation of garlic powder on rumen ecology and digestibility of nutrients in ruminants. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88 (13): 2231–2237.

Wang Y., Douglas G. B., Waghorn G. C., Barry T. N., Foote A. G. and Purchas R. W. 1996. Effects of condensed tannins upon the performance of lambs grazing Lotus corniculatus and lucerne (Medicago sativa). The Journal of Agricultural Science, 126: 87–98.

Wang Y., McAllister T. A., Yanke L. J., Xu Z. J., Cheeke P. R. and Cheng K. J. 2000. In vitro effects of steroidal saponins from *Yucca schidigera* extract on rumen microbial protein synthesis and rumen fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 2114–2122.

Yang W. Z., Ametaj B. N., Benchaar C., He M. L. and Beauchemin K. A. 2010. Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: Intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. Journal of Animal Science, 88: 1082-1092.

Yang W. Z., Benchaar C., Ametaj B. N., Chaves A. V. and McAllister T. A. 2007. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. Journal of Dairy Science, 90: 5671–5681.

Animal Production Research
Vol. 3, No. 4, 2015 (75-88)

University of Guilan

Effect of free thymol and sustained release thymol on rumen fermentation and plasma metabolites in sheep

Z. Zamani[1], D. Alipour[2*], H. R. Moghimi[3], S. A. Mortazavi[4], S. M. Zolhavarieh[5]

1. PhD graduated student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University
3. Professor of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences
4. Professor of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences
5. Assistant Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Paraveterinary Science, Bu-Ali Sina University

(Received: 12-8-2014 – Accepted: 24-1-2015)

Abstract

This experiment was conducted to compare the effect of free and sustained release thymol on rumen fermentation characteristics, microbial protein and some plasma metabolites. Six ruminally cannulated sheep were used in a 3×3 merged Latin square design. Treatments were (a) basal diet+ 250 mg free Thymol, (b) basal diet+ 250 mg slow relrase Thymol and (c) control (basal diet without Thymol). The experiment consisted of three 14-d periods with 10 d adaptation and 4 d sampling. At sampling period, the feces were collected and at the end of each period blood sampling and rumen fluid collection were made at different times. The measured traits were: Feed digestability, N-NH3, plasma and glucose concentration, ruminal pH, microbial protein synthesis and efficiency of microbial protein synthesis. Dry matter intake (985.5 g and 917.5 g per day, respectively), crude protein digestibility (82.7% and 85.6%, respectively) and plasma glucose (114.8 mg/dL and 108 mg/dL, respectively) were increased by free and sustained release thymol consumption ($P<0.05$). Plasma urea concentration, microbial protein synthesis and N-NH3 were decreased in 5 and 7 hours after feeding ($P<0.05$). Number of diplodinia was 0.38×10^5 in diet with free thymol and this number was lower than those in other two treatments ($P<0.05$). Thymol consumption improved the efficiency of dietary protein utilization by decreasing N-NH3 and increased level of plasma glucose showed a positive effect on energy utilization of animal.

Keywords: Ammonia, Microbial protein, Thymol, Glucose

*Corresponding author: alipourd@basu.ac.ir