تحقیقات تولیدات دامی

سال هشتم/شماره اول/بهار ۱۳۹۸ (۵۱-۴۱)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

اثر سطوح مختلف اسانس رازیانه بر فراسنجه‌های تولید گاز و جمعیت پروتوزوآی شکمبه بز در شرایط برون‌تنی

سمیه میرزائی چشمه‌گچی[۱]، محمدمهدی معینی[۲*]، فردین هژبری[۲]، محمدابراهیم نوریان سرور[۳]

۱- دانشجوی دکتری علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی

۲-دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۱۹)

چکیده

این بررسی برای ارزیابی اثر سطوح مختلف اسانس رازیانه (صفر، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بر پتانسیل تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و جمعیت پروتوزوآ در شرایط برون‌تنی انجام شد. مایع شکمبه از شش رأس بز مرغوز در حالت ناشتا و با استفاده از لوله مری جمع‌آوری شد. گاز تولیدی در ۹۶ ساعت گرم‌خانه‌گذاری ثبت شد. اثر اسانس بر تعداد پروتوزوآی کل و جنس‌های مختلف بررسی شد. همچنین، کل گاز تولیدی بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، متان تولیدی و برخی دیگر از فراسنجه‌های تخمیر شکمبه نیز برآورد شد. پتانسیل تولید گاز و سرعت تخمیر تحت تأثیر اسانس رازیانه کم شدند (P<۰/۰۰۰۱) و فاز تأخیر در سطوح کم افزایش نشان داد (P=۰/۰۰۴). فراسنجه pH ثابت ماند و تولید نیتروژن آمونیاکی و غلظت کل اسیدهای چرب فرار در سطوح ۷۵۰ و ۱۰۰۰ کاهش یافت. گاز تولیدی ۲۴ ساعت، تولید گاز متان، میزان ماده آلی واقعاً تجزیه شده و انرژی قابل متابولیسم کم شد، اما ضریب تفکیک‌پذیری، تولید توده میکروبی و بازده آن افزایش نشان داد (P<۰/۰۰۰۱). افزودن اسانس به محیط تخمیر، تعداد پروتوزوآی کل (P<۰/۰۰۰۱) و جنس‌های *انتودینیوم*، *ایزوتریشیا* را کاهش داد، اما تغییری در تعداد *دیپلودینیوم* و *افریواسکولکس* ایجاد نکرد. نتایج این بررسی نشان داد که اسانس رازیانه دارای خواص ضد پروتوزوآیی انتخابی علیه *انتودینیوم* و *ایزوتریشیا* بوده و پتانسیل تغییر تخمیر شکمبه را با کاهش تولید گاز متان و آمونیاک و افزایش ضریب تفکیک‌پذیری دارد.

واژه‌های کلیدی: اسانس رازیانه، تخمیر برون تنی، ضریب تفکیک‌پذیری، متان، نیتروژن آمونیاکی

* نویسندهٔ مسئول: mmoeini@razi.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2019.10750.1330

مقدمه

نشخوارکنندگان با میکروارگانیسم‌های شکمبه رابطه همزیستی دارند، اما این ارتباط، ناکارآمدی انرژی و پروتئین را به همراه دارد (Van Nevel and Demeyer, 1988). مواد خوراکی دریافتی در نشخوارکنندگان با میکروارگانیسم‌های شکمبه تخمیر و هضم شده و اسیدهای چرب فرار، توده میکروبی و محصولات دیگری از قبیل متان، دی اکسیدکربن و آمونیاک تولید می‌شود (Pen, 2007; Martin *et al*., 2009). متان یک گاز گلخانه‌ای است و نشخوارکنندگان به عنوان یکی از تولیدکنندگان عمده متان هستند (Johnson and Johnson, 1995). از طرفی تولید متان در شکمبه سبب از دست رفتن ۱۳/۱۵ کیلوکالری بر گرم انرژی می‌شود (Lee *et al*., 2003). برآوردها نشان می‌دهند که این میزان هدرروی انرژی خام جیره به صورت متان بین ۲ تا ۱۲ درصد است (Johnson and Johnson, 1995;Agarwal *et al*., 2009). هدف متخصصین تغذیه در دستکاری اکوسیستم میکروبی شکمبه بهبود ضریب تبدیل خوراک برای تولید محصولات قابل مصرف برای انسان‌ها است. در سال‌های اخیر بیشتر پژوهش‌ها به بررسی اثرات استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی بر تخمیر شکمبه متمرکز شده است. یک رویکرد، استفاده از افزودنی‌های خوراکی به جیره است که بتوانند اکوسیستم میکروبی را تغییر داده و ضایعات تخمیر (متان و آمونیاک) را کاهش دهند. در گذشته آنتی‌بیوتیک‌های یون‌دوست در جیره برای کاهش هدر رفتن انرژی استفاده می‌شدند (Russell and Strobel, 1989)، اما به تازگی نگرانی عمومی استفاده از این ترکیبات به دلیل خطر باقی ماندن اثرات آن در دام و انتقال آن به انسان و ایجاد سویه‌های مقاوم به آن‌ها، ممنوع شده است (Official Journal of European Union, 2003). استفاده از اسانس گیاهان دارویی به واسطه داشتن خواص ضدمیکروبی، ضدپروتوزایی و پتانسیل کاهش تولید متان و در نتیجه توانایی دستکاری تخمیر میکروبی شکمبه، یک فرصت بی-نظیر در این مورد فراهم می‌کنند (Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2017).

رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* از مهم‌ترین و قدیمی‌ترین گیاهان دارویی ایران و متعلق به خانواده چتریان (*Apiaceae*) است. تمام پیکره رازیانه به خصوص دانه آن دارای مواد مؤثره است (زرگری، ۱۳۶۷) مهم‌ترین ترکیب اسانس این گیاه دارویی آنتول است که در صنایع دارویی و عطرسازی اهمیت دارد. فنچول، لیمونن و متیل‌کاویکول نیز از دیگر ترکیبات رازیانه هستند (لباسچی و همکاران، ۱۳۸۸). از آنجا که فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها به ترکیبات فنولی و ترپنوئیدی موجود در آن‌ها نسبت داده می‌شود (Chao *et al*., 2000) و همچنین با توجه به نتایج گزارش شده از تأثیر ضدمیکروبی و مهار باکتری‌های گرم مثبت و کاهش نسبت تولید استات به پروپیونات و تولید نیتروژن آمونیاکی و گاز متان در شکمبه به واسطه ترکیبات مؤثره موجود در اسانس‌ها (Hooks *et al*., 2010)، انتظار می‌رود اسانس رازیانه با داشتن ترکیبات مؤثره فعال از جمله آنتول از راه مکانیسم‌های مشابه در روند تخمیر تغییر ایجاد کند. بنابراین با توجه به اثرات اثبات شده اسانس رازیانه در تخمیر شکمبه و نبود اطلاعات کافی در مورد اثر اسانس رازیانه بر فراسنجه‌های تخمیر در شکمبه بز، هدف از این پژوهش، بررسی اثر اسانس گیاه رازیانه در شرایط برون‌تنی بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه، تولید گاز متان و جمعیت پروتوزوآیی بود.

مواد و روش‌ها

بزهای مورد استفاده در این پژوهش در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی نگهداری شدند و تمامی مراحل آزمایش‌ها در آزمایشگاه تغذیه دام دانشکده انجام شد. مایع شکمبه از شش رأس بزغاله ۵ ماهه نر نژاد مرغوز تغذیه شده با علوفه یونجه با استفاده از لوله مری و در حالت ناشتا جمع‌آوری و مخلوط شد. اسانس رازیانه از دانه خشک شده آن با تقطیر آبی و به مدت سه ساعت با دستگاه کلونجر بر اساس روش بریتیش‌فارماکوپیا استخراج شد (British Pharmacopoeia, 1988). محلول‌های استوک با حل کردن اسانس در اتانول مطلق (جرمی/حجمی) تهیه شد. به این صورت که ابتدا یک محلول استوک از جرم مشخصی از اسانس با حجم برابر از اتانول تهیه و از این محلول استوک سطوح مورد نظر برداشته شد. حجم‌های مساوی از اتانول (۱ درصد حجمی/حجمی) به بطری‌های بلانک اضافه شد.

ترکیب شیمیایی علوفه یونجه مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است. مقدار ماده خشک جیره با استفاده از آون در حرارت ۱۰۵ درجه سلسیوس برای مدت ۲۴ ساعت تعیین شد. خاکستر خام، پروتئین خام و چربی خام با استفاده از روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (AOAC, 1990). همچنین درصد ماده آلی یونجه از اختلاف ماده خشک با خاکستر خام محاسبه شد. الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) با استفاده از روش ون‌سوست (Van Soest *et al*., 1991) اندازه‌گیری شد.

آزمون تولید گاز: آزمون تولید گاز با استفاده از روش Menke *et al*. (1979) انجام شد. علوفه یونجه مورد استفاده در آزمایش برون‌تنی بعد از خشک کردن در آون، با کمک آسیاب Foss مدل Cyclotec™ 1093 و الک یک میلی‌متری آسیاب شد. شیرابه شکمبه قبل از خوراک وعده صبح با استفاده از لوله مری از بزهای نر اخته جمع‌آوری شد و درون فلاسک ایزوله به سرعت به آزمایشگاه منتقل شد.

مایع شکمبه با استفاده از چهار لایه پارچه نخی، صاف شد و برای ایجاد شرایط بی‌هوازی به طور پیوسته با دی‌اکسیدکربن گازدهی و تا قبل از تلقیح در ۳۹ درجه سیلسیوس نگهداری شد. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم یونجه در داخل هر بطری ویتن (سه بطری برای هر تیمار) ریخته شد. تیمارهای مورد آزمایش شامل سطوح ۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم اسانس رازیانه بود. بطری‌های بلانک نیز محتوی ترکیبات بالا بدون یونجه در نظر گرفته شد (اتانول خالص برای تیمار شاهد و بلانک مثبت در نظر گرفته شد). مایع شکمبه صاف شده با نسبت ۲ به ۱ با بزاق مصنوعی مخلوط شد. مقدار ۳۰ میلی‌لیتر محلول مایع شکمبه بافری شده به هر بطری اضافه شد و سپس بطری‌ها درگرم‌خانه شیکردار با دمای ۳۹ درجه سلسیوس قرار داده شدند. فشار گاز تولیدی در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۳۲، ۴۸، ۷۲، ۸۰ و ۹۶ ساعت پس از گرم‌خانه‌گذاری با دستگاه فشارسنج (Testo, Germany) ثبت شد. داده‌های گاز حاصل با در نظر گرفتن موقعیت جغرافیایی شهر کرمانشاه تبدیل به حجم شد (Lopez *et al*., 2010). برآورد فراسنجه‌های گاز از راه معادله زیر انجام شد (Schofield and Pell, 1994):

$$y = B(1 - exp - c \times [t - L]$$

که در آن، y حجم گاز تولیدی در واحد زمان (ml)، B پتانسیل گاز تولیدی (ml/gDM)، c نرخ تولید گاز (/h) و L مدت زمانی است که طول می‌کشد تا میکروارگانیسم‌ها به ذرات غذایی بچسبند.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های تخمیر: برای تعیین اثر سطوح مختلف اسانس رازیانه بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بعد از اتمام ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، میزان گاز تولیدی هر یک از بطری‌ها با فشارسنج اندازه‌گیری و ثبت شد. بعد از توقف تخمیر با قرار دادن بطری‌ها در مجاورت با یخ، pH مایع شکمبه با استفاده از pHمتر (Inolab level2, Germany) اندازه‌گیری و ثبت شد و از بخش مایع محتویات بطری‌های ویتن برای تعیین نیتروژن آمونیاکی، کل اسیدهای چرب فرار و شمارش پروتوزوآ نمونه‌برداری شد. اندازه‌گیری کل اسیدهای چرب فرار با دستگاه مارخام و به روش Barnett and Reid (1957) اندازه‌گیری شد. میزان انرژی قابل متابولیسم بر اساس معادله زیر برآورد شد (Menke *et al*., 1979):

$$ME_{(MJ/kg\ DM)} = 2.20 + 0.136 \times Gp + 0.0057 \times CP + 0.00029 \times EE^2$$

که در آن، Gp گاز تولیدی، CP پروتئین خام و EE عصاره اتری بود.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی یونجه (درصد)

Table 1. Chemical composition of alfalfa (%)

Nutrient	Dry Matter	Organic Matter	Ash	Crude Protein	Ether Extract	NDF[1]	ADF[2]	NFC[3]	ME[4] (MJ/kg DM)
Alfalfa	93.6	93.0	7.0	13.86	1.56	54.4	39.6	22.85	10.12

1: Neutral detergent fiber, 2: Acid detergent fiber, 3: Non-fiber carbohydrate, 4: Metabolizable energy

اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی بر اساس روش Broderick and Kang (1980) انجام شد. در این روش مقدار نیتروژن آمونیاکی با استفاده از معرف‌های فنول، هیپوکلریت، استاندارد آمونیاک و اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (CARY100، Scan_UV_Visible مدل VARIAN) در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. قابلیت هضم ماده آلی به روش برون‌تنی بر اساس رابطه زیر محاسبه شد (Makkar, 2010):

$$OMDe_{(mg)} = c - (a-b)$$

که c وزن ماده آلی وزن شده در هر بطری (میلی‌گرم)، a مقدار ماده تجزیه نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و b مقدار خاکستر مواد تجزیه نشده (میلی‌گرم) بود. میزان ضریب تفکیک (PF) بر اساس رابطه ذکر شده در بخش زیر با تقسیم وزن مقدار ماده خشک تجزیه شده (بعد از هضم در محلول شوینده خنثی) بر مقدار گاز تولید شده بعد از ۲۴ ساعت بدست آمد (Blummel *et al*., 1997). برآورد تقریبی توده میکروبی (MM) مطابق رابطه زیر از تفاوت توده بقایای اولیه و بقایای شسته شده در محلول محاسبه شد (Blummel *et al*., 1997):

$$MM_{(mg)}=[c-(a-b)]-[NG\ (ml) \times 2.2]$$

$$PF=OMDe/IVGP=c-(a-b)/IVGP$$

که در آن، NG میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی، 2.2 ضریب استوکیومتری و IVGP گاز تولیدی طی ۲۴ ساعت بود. برآورد تولید گاز متان بر اساس روش‌های استاندارد ارائه شده و با تزریق ۴ میلی‌لیتر سود ۱۰ نرمال داخل بطری‌ها و سپس اندازگیری مقدار گاز داخل آن‌ها و بر اساس رابطه زیر انجام شد (Demeyer *et al*., 1988 and Fievez *et al*., 2005).

۱۰۰×[گازساعت۲۴ (میلی‌لیتر) قبل از تزریق سود/ (۱۵-گاز بعد از تزریق سود (میلی‌لیتر))]= ٪گاز متان

شمارش پروتوزوآ: شمارش پروتوزوآ بر اساس روش Dehority (2003) انجام شد. برای شناسایی و شمارش پروتوزوآ نمونه مایع شکمبه بعد از پایان ۲۴ ساعت گرم خانه‌گذاری با نسبت مشخص با محلول فرمال سالین مخلوط شد و در یخچال معمولی در دمای ۴ درجه سیلسیوس نگهداری شد. شمارش با میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی X_{10} و از راه کاربرد نرم‌افزار دینوکاپچر انجام شد. سپس سه زیرخانواده *انتودینینه*[1]، *افریوایکلوسینیه*[2] و *دیپلودینینه*[3] و خانواده *ایزوتریشیدا*[4] بر اساس شکل و اندازه و وجود یا عدم وجود صفحه اسکلتی شناسایی و شمارش شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS18.01 (2009) انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با آزمون ناپارامتری کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. مقایسات چند جمله‌ای جهت تعیین رابطه خطی، درجه دوم و درجه سوم روند تغییرات صورت گرفت. طرح آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش، طرح کاملاً تصادفی بود و از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین بین تیمارها استفاده شد. مدل آماری مورد استفاده برای داده‌های ثبت شده به صورت زیر بود:

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

که در این معادله، Y_{ij} مشاهده تیمار iام، μ میانگین کل، T_i میانگین iمین تیمار و e_{ij} اثر خطای آزمایش است.

نتایج و بحث

اثر اسانس رازیانه بر تولید گاز و کینیتیک تخمیر: نتایج آزمایش تولید گاز (جدول ۲) نشان داد که اسانس رازیانه سبب کاهش پتانسیل تولید گاز (B) شد. نرخ تولید گاز (c) نیز در سطوح ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ تحت تأثیر اسانس کاهش یافت (P<۰/۰۵). فاز تأخیر (L) در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ نسبت به شاهد افزایش یافت، اما سطوح ۷۵۰ و ۱۰۰۰ این اسانس تفاوتی با شاهد نداشت (P<۰/۰۵). کاهش در تولید گاز می‌تواند به کاهش فعالیت‌های تخمیری میکروارگانیسم‌ها مربوط باشد. محققان کاهش در گاز کل تولیدی را ناشی از کاهش در قابلیت هضم ماده خشک دانسته‌اند (Tan *et al*., 2011). مشابه با نتایج این بررسی، در مطالعه‌ای (Talebzadeh *et al*., 2012) افزودن اسانس زنیان به سرنگ‌های تولیدگاز، مقدار گاز تولیدی را کاهش داد. همچنین مشاهده کرده‌اند که افزودن اسانس مرزنجوش تا

1. *Entodinium* spp
2. *Ophryoscolecinae*
3. *Diplodiniinae*
4. *Isotricha* spp

جدول ۲- اثر سطوح مختلف اسانس رازیانه بر گاز تولیدی و کینتیک تخمیر به روش برون‌تنی

Table 2. Effect of different levels of fennel essential oil on gas production and *in vitro* kinetics of fermentation

Parameter	Essential oil (µg/mL)						SEM	Contrasts		
	0	100	250	500	750	1000		L	Q	C
B (ml/g DM)	281.56^{d}	167.90^{c}	172.96^{c}	110.46^{b}	102.07^{ab}	92.38^{a}	15.84	0.000<	0.001	0.049
c (/h)	0.051^{b}	0.019^{a}	0.011^{a}	0.023^{a}	0.055^{b}	0.086^{c}	0.006	0.000<	0.000<	0.000<
L (h)	1.30^{a}	12.33^{b}	16.00^{b}	12.93^{b}	5.19^{a}	1.50^{a}	1.48	0.009	0.204	0.004
Gas24 ml/g OMD	24.08^{e}	23.34^{e}	17.56^{d}	10.36^{c}	6.07^{b}	2.08^{a}	0.255	0.000<	0.131	0.002
Methane ml/g OMD	29.97^{c}	21.67^{bc}	16.49^{b}	15.45^{a}	12.19^{a}	13.11^{a}	1.58	0.000<	0.251	0.322

B: the asymptotic gas volume; c: the rate constant; L: lag time. L: linear; Q: quadratic; C: cubic; SEM: standard error of the means; $P < 0.001$.

۸۳ درصد تولید گاز را کاهش داد (Macheboeuf *et al*., 2008). اعتقاد بر این است که ترکیب سوبسترا و روش گرم‌خانه‌گذاری ممکن است تفاوت‌هایی در فراسنجه‌ها و روند تخمیر ایجاد کند (Groot, 1996).

اثر اسانس رازیانه بر فراسنجه‌های تخمیر: اثر افزودن سطوح مختلف اسانس رازیانه بر فراسنجه‌های تخمیر در جدول ۳ بیان شده است. در اثر افزودن اسانس رازیانه فقط در سطح ۱۰۰۰ میکروگرم، pH محیط کشت افزایش یافت (*P*=۰/۰۴۲). گرچه در همه سطوح، pH در دامنه مطلوب و طبیعی برای جیره علوفه‌ای (۷/۰-۶/۷) قرار دارد (Cheng *et al*., 1995). در بررسی پوربایرامیان و همکاران (۱۳۹۴)، افزودن پودر مونزین و لیمو ترش اثری بر pH نداشت. بر اساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت نیتروژن آمونیاکی، مقادیر آمونیاک همه تیمارها در دامنه طبیعی (۳۰۰-۸۵ میلی‌گرم در لیتر) بود (Mcdonald *et al*., 2010) و فقط در سطوح ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، غلظت آن در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت (خطی، (*P*=۰/۰۱۴). نتایج آزمایش‌های متعدد نشان داد که اثر اسانس‌ها در آزمایش‌های مختلف بر غلظت آمونیاک از روند یکسانی پیروی نمی‌کند. آزمایش‌های برخی پژوهشگران نشان‌دهنده عدم تغییر در غلظت نیتروژن آمونیاکی پس از افزودن کارواکرولوتیمول (Benchaar *et al*., 2007) یا اسانس‌ها (طالب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۲) به محیط کشت است. در تعدادی از پژوهش‌ها، افزودن اسانس سبب کاهش (Chaves *et al*., 2008; Macheboeuf *et al*., 2008) و یا افزایش (Patra and Saxena, 2009) غلظت نیتروژن آمونیاکی شده است. تولید آمونیاک در شکمبه به دلیل فعالیت باکتری‌های پروتئولیتیک و باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک زیاد است (Mcintosh *et al*., 2003). نتایج مشابهی نیز مبنی بر کم شدن نیتروژن آمونیاکی در حضور گیاه دارای ساپونین (Pen *et al*., 2006) و عصاره گیاهی دارای ساپونین (Pen, 2007) و ساپونین چای (Mao *et al*., 2010) گزارش شده است. از طرفی Wallace *et al*. (2002)، کاهش تولید آمونیاک در شرایط برون تنی بدون تغییر در فعالیت پروتئولیتیک به سبب افزودن مخلوطی از اسانس‌های تجاری و همچنین کاهش ۲۵ درصدی در فعالیت دآمیناسیون باکتریایی (Newbold *et al*., 2004) را گزارش نموده‌اند. با وجود این، Chaves *et al*. (2008) تغییری در غلظت نیتروژن آمونیاکی، فعالیت‌های پروتئولیتیک و دآمیناسیون به سبب استفاده از اسانس دارچین مشاهده نکردند. همچنین Razzaghi *et al*. (2016) با افزودن دانه آفتاب‌گردان تغییری در غلظت نیتروژن آمونیاکی محتوای شکمبه گاو شیری مشاهده نکردند.

اندازه‌گیری غلظت کل اسیدهای چرب فرار نشان داد که فقط سطوح ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم اسانس سبب کاهش این فراسنجه نسبت به گروه شاهد شد (*P*=۰/۰۰۴). از آنجایی که تغییر در تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر انعکاسی از تغییر در تولید گاز است (Makkar, 2010)، کاهش کل اسیدهای چرب فرار نیز با کاهش گاز تولیدی همراه بود. مشابه این پژوهش، سطوح مختلف اسانس نارگیل و پودر سیر سبب کاهش گاز تولیدی در مدت ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد که به دلیل کاهش تولید متان گزارش شده است (Kongmun *et al*., 2010). ممکن است اثر مخلوط اسانس‌ها بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار به اجزای سازنده جیره وابسته باشد. زیرا در یک تحقیق (Benchaar *et al*., 2007) گزارش شد که مخلوط اسانس‌ها موجب افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار در گاوهای دریافت‌کننده سیلاژ یونجه شد، اما در گاوهای دریافت‌کننده

سیلاژ ذرت سبب کاهش غلظت این فراسنجه شد. همچنین گزارش شده است اسانس آنیسون (دارای ماده مؤثره آنتول) به روش برون‌تنی و با استفاده از مایع شکمبه گوساله گوشتی سبب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی و عدم تغییر تولید اسیدهای چرب فرار شده است. گرچه در پژوهش دیگر، افزودن ۰/۲۲ میلی‌گرم در لیتر اسانس آنیسون در روش کشت پیوسته بدون تأثیر بر اسیدهای چرب فرار کل سبب افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی شده است (Cardozo 2004, 2005).

گاز متان تولیدی با افزودن اسانس رازیانه تحت تأثیر تیمار آزمایشی قرار گرفت (جدول ۳) و به صورت خطی کاهش یافت (P<۰/۰۰۰۱). تمام سطوح استفاده شده از اسانس رازیانه در این پژوهش سبب تغییر در تولید گاز ۲۴ ساعته نسبت به شاهد شد (P<۰/۰۰۰۱). تولید گاز در شرایط برون‌تنی می‌تواند نشان‌دهنده تخمیر کربوهیدرات‌های موجود در نمونه باشد، که این کاهش گاز دلیلی بر کاهش فرآیند تخمیر و کاهش در تجزیه ماده آلی است. کاهش تولید گاز سبب کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و کاهش انرژی قابل متابولیسم می‌شود (جدول ۳). در مطالعه‌ای مشاهده شد که افزودن اسانس مرزنجوش تا ۸۳ درصد تولید گاز را کاهش داد (Macheboeuf *et al*., 2008). همچنین کارواکروال و تیمول سبب کاهش تولید گاز شدند (Benchaar *et al*., 2007). گاز متان هم که بخش زیادی از گاز حاصل از تخمیر مواد غذایی را تشکیل می‌دهد با کاهش میزان کل گاز در اثر اسانس و ترکیبات مؤثر آن‌ها بر باکتری‌ها، پروتوزوآ و متانوژن‌ها، کاهش یافت.

متانوژن‌ها از دی‌اکسیدکربن و هیدروژن به عنوان سوبسترا برای تولید گاز متان استفاده می‌کنند. پروتوزوآ هم نقش برجسته‌ای در تولید هیدروژن دارد (Morgavi *et al*., 2010). افزودن اسانس به محیط تخمیر شاید توانسته است از راه کاهش جمعیت پروتوزوآیی یا آرکی‌ها و باکتری‌ها میزان متان تولیدی را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش دهد. ماده آلی تجزیه شده در گرم‌خانه‌گذاری ۲۴ ساعته تحت تأثیر سطوح مختلف اسانس رازیانه قرار گرفت و کاهش یافت (P=۰/۰۰۹). در بررسی‌های دیگر، افزودن کارواکرول و ایوژنول به محیط کشت سبب کاهش قابلیت هضم ماده خشک شد (Benchaar *et al*., 2007). همچنین روغن برگ دارچین (دارای ۱۴ درصد ایوژنول) سبب کاهش قابلیت هضم ماده خشک شد (Fraser *et al*., 2007). تأثیر مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی بر قابلیت هضم ماده آلی ناشی از ترکیبات مؤثر این گیاهان بر فعالیت باکتریایی و آنزیمی بیان شده است (Patra *et al*., 2006). ضریب تفکیک‌پذیری در سطح ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت، اما در دیگر سطوح افزایش یافت (P<۰/۰۰۰۱). اگرچه این سطوح با یکدیگر اختلافی را نشان ندادند. رابطه عکس بین شاخص ضریب تفکیک‌پذیری و متان تولیدی (Vercoe *et al*., 2010) در این آزمایش مشاهده شد. افزایش تولید پروتئین میکروبی همراه با کاهش متان در استفاده از ترکیبات فنولی گیاهان زیاد (Garcýa-Gonzalez *et al*., 2008; Goel *et al*., 2008) و در ساپونین چای (Hu *et al*., 2005) نیز گزارش شده است. در مطالعه‌ای (Blümmel *et al*., 1997) افزایش شاخص ضریب تفکیک‌پذیری به عنوان بهبود در راندمان تخمیر معرفی شد. در این پژوهش، به نظر می‌رسد تخمیر یونجه به طور عمده به سمت تولید پروتئین میکروبی پیش رفته است. توده میکروبی، راندمان توده میکروبی را به جز در سطح ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس، نسبت به گروه شاهد افزایش داد. بین سطوح ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰ با یکدیگر تفاوت معنی‌داری از این نظر مشاهده نشد (P<۰/۰۰۰۱).

در این پژوهش با وجود کاهش تولید گاز در اثر افزودن اسانس‌ها، توده میکروبی افزایش یافت. این پدیده می‌تواند به این دلیل باشد که ماده آلی تجزیه شده بجای اینکه به سمت تولید اسید چرب فرار و گاز متان پیش رود، بیشتر سبب تولید توده میکروبی شده است. به طور نسبی اگر تبدیل ماده آلی هضم شده به توده میکروبی در مقایسه با تولید گاز (اسیدهای چرب فرار و گاز متان) بیشتر باشد، بازده استفاده از کربن و نیتروژن افزایش می‌یابد (Makkar, 2010). در یک بررسی، افزودن اسانس نعناع اخضر به محیط کشت سبب افزایش توده میکروبی نسبت به تیمار شاهد شد (Taghavi-Nezhad *et al*., 2011). انرژی قابل متابولیسم در هر کیلوگرم ماده خشک با افزایش سطح اسانس کاهش یافت

(P<۰/۰۰۰۱). کاهش انرژی قابل متابولیسم در اثر افزودن اسانس می‌تواند به کاهش در تولید گاز تولیدی، کاهش غلظت کل اسیدهای چرب فرار و کاهش ماده آلی تجزیه شده در محیط تخمیر به ویژه در سطوح بالای آن مربوط باشد.

اثر اسانس رازیانه بر جمعیت پروتوزوآ: در حضور این اسانس تعداد پروتوزوآی کل کاهش یافت (P<۰/۰۰۰۱). تعداد پروتوزوآی جنس *انتودینیوم* در سطوح بالای اضافه شده اسانس رازیانه به شکل معنی‌داری کاهش یافت. تغییرات تعداد جمعیت انتودینیوم به صورت خطی (P<۰/۰۰۰۱) بود. پروتوزوآی جنس *ایزوتریشیا* هم تحت تأثیر افزودن اسانس رازیانه قرار گرفت، به گونه‌ای که در سطوح بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، جمعیت *ایزوتریشیا* (P=0.041). کاهش یافت. تعداد پروتوزوآی *دیپلودینیوم* در اثر افزودن سطوح مختلف این اسانس قرار نگرفت و جمعیت پروتوزوآی جنس *افریواسکولکس* فقط در سطح ۱۰۰۰ کاهش معنی‌دار نشان داد (P=0.031). با توجه به تنوع اجزای تشکیل‌دهنده نمی‌توان خصوصیات ضدمیکروبی را به یکی از اجزای تشکیل‌دهنده ارتباط داد. اجزای سازنده اسانس‌ها به طور انتخابی توانایی مهار پروتوزوآ را دارند. چنین ساختارهایی می‌توانند غشای سلول را متلاشی و آنزیم‌ها را غیرفعال کند و سوبسترا و یون‌های فلزی که برای سوخت و ساز سلول ضروری هستند را از دسترس خارج کند (Goel *et al*., 2005). نتایج مشابهی از سوی محققان دیگر (Ando *et al*., 2003) در تعداد کل پروتوزوآ، *انتودینیوم*، *ایزوتریشیا* و *دیپلودینیوم* در مایع شکمبه مکمل شده با ۲۰۰ گرم در روز نعناع فلفلی مشاهده شد. حدود ۲۵ درصد از متانوژن‌های شکمبه با پروتوزوآ دارای ارتباط هستند (Newbold *et al*., 1995). بنابراین قسمتی از اثرات ضدمیکروبی اسانس‌ها ممکن است در نتیجه یک فعالیت ضدپروتوزوآیی باشد.

در یک بررسی (Sallam *et al*., 2009)، بعد از گرم‌خانه‌گذاری ۲۴ ساعته، تعداد پروتوزوآ از $۲/۲\times۱۰^{۵}$ در هر میلی‌لیتر به $۰/۸\times۱۰^{۵}$ در هر میلی‌لیتر کاهش یافت. Santoso *et al*. (2007) ثابت کردند که در نتیجه خواص آب‌گریزی، اسانس‌های مرزنجوش و آویشن در غشای سلول نفوذ کرده و با مسیرهای متابولیکی سیستولیک تداخل ایجاد می‌کنند. در مقابل، بررسی‌های برخی پژوهش‌گران نیز نشان داد افزودن مقادیر مختلفی از اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها به جیره تأثیری بر پروتوزوآی شکمبه نداشت (Newbold *et al*., 2004; Fraser *et al*., 2007).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد که اسانس رازیانه دارای خواص ضد پروتوزوآیی انتخابی علیه *انتودینیوم* و *ایزوتریشیا* بوده و با مهار تولید گاز متان در شکمبه و کاهش تولید آمونیاک و افزایش ضریب تفکیک‌پذیری، این پتانسیل را دارد که در تخمیر شکمبه تغییرات مثبتی ایجاد کند.

جدول ۳- اثر سطوح مختلف اسانس رازیانه بر فراسنجه‌های تخمیر در شرایط برون تنی

Table 3. Effect of different levels of fennel essential oil on *in vitro* fermentation parameters

Parameter	Essential oil (µg/mL)						SEM	Contrasts		
	0	100	250	500	750	1000		L	Q	C
pH	6.65[a]	6.78[ab]	6.80[ab]	6.85[ab]	6.74[ab]	6.88[b]	0.02	0.042	0.378	0.155
NH_3-N(mg/L)	162.29[b]	120.68[ab]	142.81[ab]	112.19[ab]	101.56[a]	94.71[a]	8.70	0.014	0.792	0.731
TVFA(mmol/L)	51.66[c]	46.66[bc]	48.33[bc]	45.83[bc]	37.50[ab]	32.50[a]	2.06	0.004	0.305	0.698
OMD (mg)	179.43[c]	125.90[a]	150.20[b]	154.70[b]	139.56[ab]	146.33[ab]	4.59	0.048	0.034	0.009
PF	3.05[a]	2.60[a]	4.34[b]	4.97[b]	4.43[b]	4.92[b]	0.23	0.000<	0.046	0.062
MB(mg)	50.13[b]	19.52[a]	74.04[c]	86.33[c]	70.25[bc]	80.94[c]	0.97	0.000<	0.253	0.021
EMB (%)	27.77[b]	15.45[a]	48.98[c]	55.63[c]	49.85[c]	55.23[c]	3.77	0.000<	0.018	0.004
ME (MJ/kgDM)	10.27[e]	8.86[d]	6.99[c]	6.50[b]	6.56[b]	6.32[a]	0.35	0.000<	0.000<	0.016

NH_3-N: ammonia nitrogen; TVFA: total volatile fatty acids; OMD: *in vitro* organic matter digestibility; PF: partitioning factor; MB: microbial biomass; EMB: efficiency of microbial biomass; ME: metabolizable energy. L: linear; Q: quadratic; C: cubic; SEM: standard error of the means; P < 0.001.

جدول ۴- اثر سطوح مختلف اسانس رازیانه بر جمعیت پروتوزوآی شکمبه بز مرغوز ($\times 10^4$/میلی‌لیتر)

Table 4. Effect of different levels of fennel essential oil on protozoa population of Markhoz goat ($\times 10^4$/mL)

Parameter	Fennel essential oil (µg/mL)						SEM	Contrasts		
	0	100	250	500	750	1000		L	Q	C
Total protozoa	15.00^{d}	13.13^{cd}	11.11^{bcd}	7.78^{ab}	8.33^{abc}	3.61^{a}	1.04	0.000<	0.783	0.697
Entodinium spp.	11.39^{c}	10.00^{bc}	9.72^{ab}	6.66^{ab}	6.66^{ab}	3.33^{a}	0.735	0.000<	0.384	0.740
Isotricha spp.	0.833^{b}	0.554^{ab}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.276^{ab}	0.116	0.045	0.041	0.732
Diplodiniinae	0.833	1.11	0.833	0.557	0.833	0.00	0.193	0.241	0.488	0.872
Ophryoscolecinae	1.94^{b}	1.66^{b}	0.557^{ab}	0.557^{ab}	0.833^{ab}	0.00^{a}	0.259	0.031	0.615	0.629

L: linear; Q: quadratic; C: cubic; SEM: standard error of the means; $P < 0.001$.

فهرست منابع

پور بایرامیان ر.، پیرمحمدی ر. و امینیع. ۱۳۹۴. اثر استفاده از سطوح مختلف پودر لیموترش و مونسین بر قابلیت هضم مواد مغذی جیره، تخمیر شکمبه‌ای و متابولیت‌های خونی در قوچ ماکویی. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۳(۱): ۶۹-۵۳.

زرگری ع. ۱۳۶۷. گیاهان دارویی . جلد دوم، انتشارات دانشگاه تهران، ۹۴۶ صفحه.

طالب‌زاده م.، علیپور د.، سحرخیز م. و ملکی م. ۱۳۹۲. بررسی اثر اسانس روغنی زنیان (*CarumcopticumL.*) بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱(۳): ۳۰-۱۷.

لباسچی م. ۱۳۸۹. بررسی اثر تراکم بوته بر عملکرد گیاه دارویی رازیانه در شرایط دیم مناطق سرد. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۶(۱): ۱۳۲-۱۲۱.

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

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

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

Barnett A. J. G. and Reid R. L. 1957. Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen. I. The volatile fatty acid Production of fresh grass. Journal of Agricultural Science, 48: 315-321.

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

Blummel M., Makkar H. P. S. and Becker K. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. Journal of Animal Physiology, 77: 24-34.

British Pharmacopoeia, vol. 2 .1988. HMSO, London, pp. A137-A138.

Broderick G. A. and Kang J. H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids inruminal fluid and in vitro media. Journal of Dairy Science, 63: 64-75.

Cardozo P. W., Calsamiglia S., Ferret A. and Kamel C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. Journal of Animal Science, 82: 3230-3236.

Cardozo P. W., Calsamiglia S., Ferret A. and Kamel C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at two pH level on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. Journal of Animal Science, 83: 2572-2579.

Chao S. C., Young D. G. and Oberg C. J. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. Journal of Essental Oil Research, 12: 639-649.

Chaves A. V., He Y., Yang W. Z., Hristov A. N., McAllister T. A. and Benchaar C. 2008. Effects of essential oils on proteolysis, deamination and methanogenesis in mixed cultures of ruminal bacteria. Canadian Journal of Animal Science, 88: 117-122.

Cheng R. C., Hall G. and Burroughs W. 1955. A method for the study of cellulose digestion by wash suspensions of rumen microorganisms. Journal of Dairy Science, 38(11): 1225-1230.

Dehority B. A. 2003. Rumen Microbiology. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.

Demeyer D. I., Meulemeester M., de Graeve K. and Gupta B. W.1988. Effect of fungal treatment of nutritive value of straw. Medicine Faculty of Landbouww Rijksuniv Gentics, 53, 1811-1819.

Fraser G. R., Chaves A. V., Wang Y., Mcallister T. A., Beauchemin K. A. and 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.

Garcýa-Gonzalez R., Lopez S., Fernandez M. and Gonzalez J. S. 2008. Dose response effects of Rheum officinaleroot and Frangulaalnusbark on ruminal methane production *in vitro*. Journal of Animal Science and Technology, 145: 319-334.

Goel G., Makkar H. P. S. and Becker K. 2008. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. Journal of Applied Microbiology, 105: 770-777.

Goel G., Puniya A. K., Aguliar C. N. and Singh K. 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. Naturwissenschaften, 92: 497-503.

Groot J. C. J., Cone J. W., Williams B. A., Debersaques M. A. and Lantinga E. A. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics on *in vitro*ruminal fermentation. Journal of Animal Science and Technology, 64: 77-89.

Hu W. L., Liu J. X., Yr J. A., Wu Y. M. and Guo Y. Q. 2005. Effect of tea saponin on rumen Fermentation *in vitro*. Journal of Animal Science and Technology, 120: 333-339.

Johnson K. A. and Johnson D. E. 1995. Methane emission from cattle. Journal of Animal Science, 73: 2483-2492.

Kongmun P., Wanapat M., Pakdee P. and Navanukraw C. 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on *in vitro* fermentation using gas production technique. Journal of Livestock Production Science, 127: 38-44.

Lee H. J., Lee S. C., Kim J. D., Oh Y. G., Kim B. K., Kim C. W. and Kim K. J. 2003. Methane production potential of feed ingeredients and measured by *in vitro* gas test. Asian- Australasian Journal of Animal Science, 16: 1143-1150.

Lopez S., Makkar H.P.S. and Soliva C.R. 2010. Screening plants and plant products for methane inhibitors. Pp. 191-231 in *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies. P. E. Vercoe, H. P. S. Makkar and A. C. Schlink, Eds. Springer, Dordrecht, the Netherlands.

Macheboeuf D., Morgavi D. P., Papon Y., Mousset J. and Arturo-Schann M. 2008. Dose-responces effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. Journal of Animal Science and Technology, 145: 335-350.

Makkar H. P. S. 2010. *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In:,Vercoe P.E. H.P.S. Makkar and A.C. Schlink (Eds), *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. pp. 107–144. IAEA: Dordrecht, The Netherlands.

Mao H. L., Wang J. K., Zhou Y. Y. and Liu J. X. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. Livestock Production Science, 129: 56-62.

Mcdonald P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair L. A. and Wilkinson R. G. 2010. Animal Nutrition. 7th Edition. Oliver and Boyd Publishers (UK), 692 p.

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. Journal of Applied Environment and Microbiology, 69: 5011-5014.

Menke K. H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D. and Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs fromthe gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. Journal of Agricultural Science, 92: 217-222.

Mirzaei Cheshmehgachi S., Moeini M. M., Hozhabri F. and Nooryan Soroor M. E. 2017. Effect of essential oils of *Zataria multiflora*, *Eucalyptus globolus* and their combination on fermentation parameters using Merghoz goat rumen liquor. Iranian Journal of Applied Animal Science, 7(1): 53-59.

Morgavi D. P, Boudra H., Jouany J. P. and Michalet-Doreau B. 2004. Effect of stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigates* toxin, on *in vitro* rumen fermentation. Food Additives and Contaminants, 21: 871-878.

Morgavi D. P., Forano E., Martin C. and Newbold C. J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. Animal, 4: 1024-1036.

Newbold C. J., Lassalas B. and Jouany J. P. 1995. The importance of methanogenesis associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. Letter of Applied Microbiology, 21: 230-234.

Newbold C. J., Mcintosh F. M., Williams P., Losa R. and Wallace R. J. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Journal of Animal Science and Technology, 114: 105-112.

Official Journal of European Union. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the council of 22 September on additives for use in animal nutrition. L268/36.

Patra A. K., Kamra D. N. and Agarwal N. 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. Animal Feed Science and Technology, 128(3-4): 276-291.

Patra A. K. and Saxena J. 2009. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. Nutral Research Reviews, 22: 204-219.

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

Pen B., Sar C., Mwenya B., Kuwaki K., Morikawa R. and Takahashi J. 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. Journal of Animal Science and Technology, 129: 175-186.

Razzaghi A., Valizadeh R., Naserian A. A. and Danesh Mesgaran M. 2016. The effect of addition sucrose and sunflower seeds to the diet on lactation performance and ruminal fermentation pattern in dairy cow. Journal of Dairy Science, 99(5): 3539-3548.

Russell J. B. and Strobel H. J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. Applied Environment and Microbiology, 55: 1-7.

Sallam S. M. A., Bueno P. I. C. S., Brigide P. B. and Godoy D. M. S. S. and AbdallaVitti A. L. 2009. Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* rumen fermentation and methane production. Optios. Mediterraneennes, 85: 267-272.

Santoso B., Kilmaskossu A. and Sambodo P. 2007. Effects of saponin from Biophytumpetersianum Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. Journal of Animal Science and Technology, 137: 58-68.

Schofield P. and Pell P. 1994. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion *in vitro*: A comparison involving three forages. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853.

Taghavi-Nezhad M., Alipour D., TorabiGoudarzi M., Zamani P. and Khodakaramian G. 2011. Dose response to carvone rich essential oils of spearmint (Menthaspicata): *in vitro* ruminal fermentation kinetics and digestibility. Journal of Agricultural Science and Technology, 13: 1013-1020.

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

Tan H. Y., Sieo C. C., Abdullah N., Liang J. B. Huang X. D. and Ho Y. W. 2011. Effects of condensed tannins from Leucaena on methane production, rumen fermentation and populationns of methanogens and protozoa *in vitro*. Journal of Animal Science, 169: 185-193.

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

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

Vercoe E. P., Makkar H. P. S. and Schlink A. C. 2010. *In vitro* screening of plant resources for extranutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies (Ed.), *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis, (pp. 106-144). New York: Springer.

Wallace R. J., Mcewan N. R., Mcintosh F. M., Teferedegne B. and Newbold C. J. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 15: 1458-1468.

Animal Production Research

Vol. 8, No. 1, 2019 (41-51)

University of Guilan

Research paper

Effect of different levels of fennel essential oil on *in vitro* gas production parameters and protozoa population of goat rumen

S. Mirzaei Cheshmehgachi[1], M. M. Moeini[2*], F. Hozhabri[2], M. E. Nooriyan soror[3]

1. Ph.D Student of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Associate Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
3. Assistant Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

(Received: 01-07-2018 – Accepted: 11-10-2018)

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of different doses of fennel essential oil (100, 250, 500, 750 and 1000 µg) on *in vitro* gas production parameters and protozoa population using goat rumen fluid. Rumen fluid was obtained from six Markhoz goats before morning feeding via esophageal tube. Gas production during 96 hours of incubation was recorded. The effect of essential oil on total protozoa and different genus was investigated. Also, gas production after 24h, methane production and some of the other *in vitro* ruminal parameters were determined. Gas production potential (B) and fermentation rate (c) were decreased by inclusion of the essential oil (P<0.0001), while lag phase in low doses of the essential oil increased (P=0.004). The pH did not alter due to the addition of the essential oil, but ammonia nitrogen and total volatile fatty acids were declined at doses of 750 and 1000 µg of the essential oil. Gas 24h, methane production, *in vitro* organic matter digestibility and metabolizable energy decreased, while partitioning factor, microbial mass and its efficiency increased by adding the essential oil (P<0.0001). Adding fennel essential oil into fermentation media decreased total protozoa number and *Entodinium* spp and *Isotricha* spp (P<0.0001), but it had no effect on *Diplodiniinae* and *Ophryoscolecinae* populations. The results showed that the fennel essential oil may have selective antiprotozoal effect on *Entodinium* spp and *Isotricha* spp., and it has a good potential to change rumen fermentation by decreasing methane production, ammonia concentration and increasing the partitioning factor.

Keywords: Fennel essential oil, *In vitro* fermentation, Partitioning factor, Methane, Ammonia nitrogen

*Corresponding author: mmoeini@razi.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2019.10750.1330