Animal Production Research

Vol. 12, No. 3, 2023 (49-63)
doi: 10.22124/AR.2023.23257.1730
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effect of different levels of *Foeniculum vulgare* and *Nigella sativa* powder on rumen fermentation parameters and protozoa population of Sanjabi sheep by *in vitro* and *in vivo* methods

S. Mirzaei Cheshmehgachi[1], M. M. Moeini[2]*, H. Khamisabadi[3]

1. Ph.D. Student, Animal Science Department, Faculty of Agricultural Science and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Associate Professor, Animal Science Department, Faculty of Agricultural Science and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran
3. Assistant Professor, Department of Animal Science Research, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran

(Received: 10-12-2022 – Revised: 26-03-2023 – Accepted: 04-04-2023)

Introduction: Rumen fermentation manipulation aims to maximize the feed efficiency and increase the usefulness of rearing ruminants; in simpler words, the goal of rumen manipulation is to increase processes in rumen fermentation that are beneficial for the host animal and to reduce, change, or eliminate inefficient or harmful processes in rumen fermentation. In this regard, trying to use natural products such as medicinal plants has been widely accepted. The desire and demand of consumers to use healthy meat and livestock products has increased the research to search for natural compounds and additives of plant origin that are beneficial for animal health. The positive effects of medicinal plants on the process of microbial fermentation and reduction of greenhouse gases through their active compounds (such as anthole in fennel or thymoquinone in black seed) have been shown. The present study was designed in two experiments to evaluate the effect of different levels of *Foeniculum vulgare* and *Nigella sativa* powder on rumen fermentation parameters and protozoa population of Sanjabi sheep by *in vitro* and *in vivo* methods.

Materials and methods: The present study was designed and carried out in two experiments, *in vitro* and *in vivo*. In the first experiment (*in vitro*), 18 Sanjabi lambs (four to six months of age) with an average weight of 30.8 ± 6.7 kg were randomly divided into three groups with six replicates. Treatments included: control (basal diet without additives), fennel (basal diet plus 20 grams of fennel per kilogram of concentrate), and black seed group (basal diet plus 20 grams of black seed per kilogram of concentrate). In the second experiment (*in vitro*), 0, 5, 25, and 50 mg of fennel and black seed powder were added to the rumen liquor collected from six Sanjabi lambs (the control group of the first experiment). In both experiments, rumen liquor was taken through the esophageal tube. Gas production, pH, ammonia nitrogen concentration, total volatile fatty acids, *in vitro* digestibility of organic matter, and protozoa count were measured. In the *in vivo* experiment, the amount of excrement of sheep was measured by installing nets under the boxes of the animals. Data analysis was done using SAS statistical software. The normality of the counting data (population of protozoa) was first checked by a non-parametric Kolomogorov-Smirnov test and then analysis was done. The experimental design used in this research was completely randomized and for the first experiment, it was repeated measurements in time. Duncan's multiple range test was used to compare the mean of the treatments.

Results and discussion: The results of the *in vivo* experiment showed that the use of fennel and black seed increased the amount of digested organic matter in the rumen significantly compared to the control (P<0.05). In the *in vivo* experiment, all studied protozoa populations decreased in all treatments (P<0.05). In the *in vitro* experiment, the addition of fennel caused a significant decrease in gas production (P<0.0001), organic matter

* Corresponding author: mmoeini@razi.ac.ir

CC BY

digestibility, and microbial mass at the levels of 25 and 50 mg compared to the control (P<0.05). Ammonia nitrogen concentration at all levels of black seed and the level of 50 mg of fennel had a significant decrease compared to the control (P<0.05). Total protozoa population and *Entodinium* spp. subfamily was affected by both fennel and black seed treatments *in vitro* and showed a significant decrease (P<0.0001). The results of this study showed that black seed and fennel have anti-protozoa properties and can reduce different protozoa populations both *in vitro* and *in vivo*. Also, low levels of fennel can improve the fermentation efficiency by increasing the degraded organic matter and reducing gas production. In addition, the results obtained from this research showed that fennel and black seed medicinal plants had the potential to manipulate and change the process of rumen fermentation, and their anti-protozoal effects were evident and significant in both experiments. However, the effects of these plants on the fermentation process *in vitro* and *in vivo* did not follow the same process in most of the fermentation parameters, and *in vitro* results cannot be fully and reliably generalized to the conditions inside the rumen of live sheep.

Conclusions: The levels of fennel and black seed used in this study can reduce different protozoa populations and improve the process of rumen fermentation, although more researches are needed with different levels of these herbs to get more results.

Keywords: Volatile fatty acids, Protozoa, Rumen liquor, Ammonia nitrogen

Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of Razi University, Iran.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

How to cite this article:

Mirzaei Cheshmehgachi, S., Moeini, M. M., & Khamisabadi, H. (2023). Effect of different levels of *Foeniculum vulgare* and *Nigella sativa* powder on rumen fermentation parameters and protozoa population of Sanjabi sheep by *in vitro* and *in vivo* methods. *Animal Production Research*, *12*(3), 49-63. doi: 10.22124/AR.2023.23257.1730

تحقیقات تولیدات دامی

سال دوازدهم/شماره سوم/پاییز ۱۴۰۲ (۶۳-۴۹)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

اثر سطوح مختلف پودر دانه رازیانه و سیاه‌دانه بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و جمعیت پروتوزوا گوسفندان سنجابی به روش برون‌تنی و درون‌تنی

سمیه میرزائی چشمه‌گچی[۱]، محمدمهدی معینی[۲*]، حسن خمیس آبادی[۳]

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

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

۳- استادیار، بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۹ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۱/۰۶ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵)

چکیده

مطالعه حاضر در قالب دو آزمایش به روش برون‌تنی و درون‌تنی طراحی و اجرا شد. در آزمایش اول (درون‌تنی)، تعداد ۱۸ رأس بره چهار تا شش ماهه نژاد سنجابی با میانگین وزن ۶/۷±۳۰/۸ کیلوگرم به‌طور تصادفی به سه گروه با شش تکرار تقسیم شدند. تیمارها شامل: گروه شاهد (جیره پایه حاوی ۶۵ درصد کنسانتره و ۳۵ درصد علوفه بدون افزودنی)، گروه رازیانه (جیره پایه به‌علاوه ۲۰ گرم رازیانه در کیلوگرم کنسانتره) و گروه سیاه‌دانه (جیره پایه به‌علاوه ۲۰ گرم سیاه‌دانه در کیلوگرم کنسانتره) بودند. در آزمایش دوم (برون‌تنی)، سطوح صفر، ۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم از پودر گیاه رازیانه و سیاه‌دانه به شیرابه شکمبه جمع‌آوری شده از شش رأس بره نژاد سنجابی (گروه شاهد آزمایش اول) افزوده شد. شیرابه شکمبه در هر دو آزمایش از راه لوله مری گرفته شد. تولید گاز، pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی، کل اسیدهای چرب فرار، قابلیت هضم آزمایشگاهی و درون‌تنی ماده آلی و شمارش پروتوزوا اندازه‌گیری شد. در آزمایش درون‌تنی، همه جمعیت‌های پروتوزوایی مطالعه شده در گروه‌های تیمار شده با رازیانه و سیاه‌دانه کاهش یافت ($P<0/05$). در آزمایش برون‌تنی، افزودن دانه رازیانه سبب کاهش قابل توجهی در تولید گاز شد ($P<0/0001$) و میزان ماده آلی تجزیه شده و مقدار توده میکروبی در سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم رازیانه در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود ($P<0/05$). غلظت نیتروژن آمونیاکی در همه سطوح سیاه‌دانه و در سطح ۵۰ میلی‌گرم رازیانه، کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت ($P<0/05$). جمعیت پروتوزوای کل و زیرخانواده انتودینینه تحت تأثیر هر دو تیمار رازیانه و سیاه‌دانه در شرایط آزمایشگاهی کاهش چشمگیری داشت ($P<0/0001$). نتایج این مطالعه نشان داد که دانه سیاه‌دانه و رازیانه اثر ضدپروتوزوایی داشته و می‌توانند سبب کاهش جمعیت‌های مختلف پروتوزوایی هم در شرایط درون‌تنی و هم برون‌تنی شوند. سطوح پایین رازیانه با تأثیر بر روند تخمیر شکمبه و کاهش تولید گاز می‌توانند سبب بهبود بازدهی تخمیر از راه افزایش ماده آلی تجزیه شده شوند.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب فرار، پروتوزوا، شیرابه شکمبه، نیتروژن آمونیاکی

* نویسندهٔ مسئول: mmoeini@razi.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2023.23257.1730

مقدمه

دست‌کاری تخمیر شکمبه به جهت به حداکثر رساندن بازده استفاده از خوراک و افزایش سودمندی از پرورش نشخوارکنندگان است. در واقع، هدف دست‌کاری شکمبه، افزایش فرآیندهایی در تخمیر شکمبه است که برای حیوان میزبان مفید باشد و کاهش، تغییر یا حذف فرآیندهای ناکارآمد یا زیان‌آور در تخمیر شکمبه را مدنظر قرار می‌دهد (Nagaraja *et al*., 1997). تمایل و تقاضای مصرف‌کنندگان به استفاده از گوشت و محصولات دامی سالم موجب افزایش تحقیقات برای جست‌وجوی ترکیبات طبیعی و افزودنی‌های با منشأ گیاهی که برای سلامت حیوان مفید باشد شده است (Galyean *et al*., 1999; Wistuba *et al*., 2005). تلاش برای استفاده از محصولات طبیعی نظیر گیاهان دارویی به عنوان افزودنی‌های خوراکی جهت بهبود راندمان استفاده از خوراک و عملکرد تولیدی، مورد پذیرش عمومی قرار گرفته است (Aboul-fotouh *et al*., 1999). محققان پیشنهاد دادند که ترکیبات فعال گیاهان دارویی (مانند آنتول در رازیانه یا تیموکوئینون در سیاه‌دانه) از راه ایجاد پیوند با استرول غشای تک یاختگان سبب تغییر نفوذپذیری یاخته شده که در نهایت باعث تجزیهٔ یاخته‌ای تک یاختگان می‌شود (Benchaar *et al*., 2008). خواص ضد پروتوزوآیی و کاهش تولید متان و آمونیاک و افزایش عامل تفکیک-پذیری در اثر افزودن اسانس رازیانه به محیط تخمیر در شرایط برون‌تنی گزارش شده است (Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2019). رازیانه گیاهی دارویی از خانواده چتریان (Apiaceae) و با نام علمی *Foeniculum vulgare* است که مهم‌ترین ترکیبات فعال آن آنیتول و فنچون گزارش شده است (Renjie and Shishidi, 2010). دانهٔ رازیانه مهم‌ترین بخش دارویی آن محسوب می‌شود (Grieve, 1984). مطالعات برون‌تنی، آثار مثبت رازیانه بر روند تخمیر میکروبی و کاهش گازهای گلخانه‌ای را نشان داده است (Patra *et al*., 2006; Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2019). سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sativa* جزء خانواده آلاله (*Ranunculaceae*) است (Cronquist, 1981). این گیاه از دیرباز یکی از گیاهان دارویی پرمصرف در طب سنتی بوده است. خواص دارویی این گیاه به دانه‌های آن مربوط می‌شود که منبع اصلی ترکیبات مؤثره آن است (Goreja, 2003). ترکیبات اصلی دانه سیاه‌دانه شامل روغن فرار و غیر فرار، ساپونین، فلاونوئید و آلکالوئیدها است (Nergiz and Otles, 1998). تیموکینون، تیموهیدروکینون و نیژلون به عنوان ترکیبات فعال اصلی در سیاه‌دانه شناخته شده‌اند (Babayan *et al*., 1997). در یک مطالعه، اثر مکمل سیاه‌دانه (۱/۲ درصد در جیره‌های با کنسانتره کم یا زیاد) بر کاهش جمعیت پروتوزوای شکمبه بره‌ها گزارش شده است (Cherif *et al*., 2018). از طرفی، اثر سیاه‌دانه بر تغییر روند تخمیر شکمبه و کاهش اسیدهای چرب در بره‌های نژاد دورپر نیز گزارش شده است (Odhaib *et al*., 2018)، در حالی که در یک مطالعه برون‌تنی، میزان ۵۷/۳ میلی‌گرم سیاه‌دانه آسیاب شده در ۱۴۲/۷ میلی‌گرم خوراک پایه سبب افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار کل شد. به هر حال، مطالعات اندکی آثار افزودن این گیاه به تخمیر شکمبه را بررسی کرده‌اند (Nemati Shirzai *et al*., 2012). بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر سطوح مختلف رازیانه و سیاه‌دانه بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و جمعیت پروتوزوا در قالب دو آزمایش درون‌تنی و برون‌تنی در گوسفندان نژاد سنجابی بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول: عملیات اجرایی این آزمایش در گوسفندداری دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه و بررسی فراسنجه‌های تخمیر شکمبه در آزمایشگاه‌های تغذیه دام صورت گرفت. در آزمایش اول، تعداد ۱۸ رأس بره چهار تا شش ماهه نژاد سنجابی با میانگین وزن ۶/۷±۳۰/۸ کیلوگرم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به سه گروه شش رأسی تقسیم شدند. طول مدت آزمایش، ۷۴ روز بود که ۱۴ روز اول آن به عنوان دوره سازگاری به منظور عادت‌دهی گوسفندان به جایگاه و جیره آزمایشی صورت گرفت. در آزمایش درون‌تنی، نمونه‌گیری از دام‌ها جهت مطالعه فراسنجه‌های تخمیر در شکمبه در سه بازه زمانی ابتدای آزمایش، روز ۳۰ و روز ۶۰ آزمایش انجام شد. شیرابه شکمبه از راه لوله مری گرفته شد. جیره پایه بر اساس جدول احتیاجات غذایی NRC (2007) تنظیم شد و شامل ۳۵ درصد علوفه و ۶۵ درصد کنسانتره بود (جدول ۱). نمونه کاملی از این جیره بعد از خشک‌کردن در آون با کمک آسیاب Foss مدل 1093 Cyclotec^{TM} و الک یک میلی-متری آسیاب و در آزمایش برون‌تنی استفاده شد. تیمارهای

آزمایش اول شامل: گروه شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)، گروه رازیانه (جیره پایه به‌علاوه ۲۰ گرم رازیانه در کیلوگرم کنسانتره) و گروه سیاه‌دانه (جیره پایه به‌علاوه ۲۰ گرم سیاه‌دانه در کیلوگرم کنسانتره) بودند. تجزیه تقریبی جیره آزمایشی (جدول ۱) و گیاهان مورد مطالعه (جدول ۲) بر اساس روش‌های استاندارد AOAC انجام شد. شیرابه شکمبه از همه بره‌ها بعد از خوراک‌دهی صبح با استفاده از لوله مری گرفته شد و در درون فلاسک، جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد و از این شیرابه شکمبه جهت بررسی فراسنجه‌های تخمیر استفاده شد.

آزمایش دوم (برون‌تنی): آزمایش دوم این مطالعه در آزمایشگاه‌های تغذیه دام گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی انجام شد. در آزمایش برون‌تنی از گوسفندان گروه شاهد (شش رأس) قبل از خوراک‌دهی صبح با استفاده از لوله مری، شیرابه شکمبه گرفته شد و در درون فلاسک، جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه، شیرابه شکمبه در شرایط بی‌هوازی (گازدهی مداوم با دی اکسید کربن) و با حفظ دمای ۳۹ درجه سلسیوس از چهار لایه پارچه پنیر صاف شد و سپس با بزاق مصنوعی ترکیب شد. مطابق با روش استاندارد، میزان ۵۰۰ میلی‌گرم سوبسترا (جیره پایه به‌علاوه پودر دانه رازیانه یا سیاه‌دانه) به همراه ۴۰ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه بافری شده به بطری‌های ویتن افزوده شد و بطری‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (Menke and Steingass, 1988). جیره پایه در آزمایش برون‌تنی نیز مشابه جیره مصرفی بره‌ها بود. تیمارهای آزمایش دوم شامل سطوح صفر، ۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مایع شکمبه گیاه رازیانه و سیاه‌دانه بود. بطری‌های شاهد بدون افزودنی (پودر دانه رازیانه یا سیاه‌دانه) و بطری‌های بلانک بدون جیره پایه و افزودنی بالا و تنها حاوی شیرابه شکمبه بافری شده در نظر گرفته شد. بعد از اتمام ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، میزان گاز تولیدی هر یک از بطری‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد. بعد از سرد شدن بطری‌ها و توقف تخمیر، ابتدا اسیدیته شیرابه شکمبه با استفاده از pH متر اندازه‌گیری و ثبت شد و از بخش مایع محتویات بطری‌های ویتن جهت اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار و شمارش پروتوزوا نمونه‌برداری شد.

اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی: اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی بر اساس روش Broderick and Kang (1980) و با استفاده از معرف‌های فنول، هیپوکلریت، استاندارد آمونیاک و اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (CARY100، Scan_UV_Visible مدل VARIAN) صورت گرفت. داده‌های به‌دست آمده از جذب نوری در نرم افزار EXCEL برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و بر اساس منحنی استاندارد و معادله خط، غلظت نیتروژن آمونیاکی هر یک از نمونه‌ها تعیین شد.

جدول ۱- اجزای جیره آزمایشی و ترکیب شیمیایی آن (٪)

Table 1. Experimental diet components and its chemical composition (%)

Ingredient	Percent in dry matter
Straw	10
Alfalfa hay	25
Wheat bran	5
Barley	28
Corn	16
Soybean meal	13.3
Mineral and vitamin premix	1.5
Urea	0.5
Bicarbonate	0.5
Salt	0.2
Chemical composition	
Metabolisable energy	2.51
Dry matter	93.23
Crude protein	15.27
Ether extract	2.72
Ash	7.59
Neutral detergent fiber (NDF)	36.03
Acid detergent fiber (ADF)	20.27

جدول ۲-ترکیب شیمیایی رازیانه و سیاه‌دانه (درصد در ماده خشک)

Table 2. Chemical composition of experimental plants (percent in dry matter)

Sample	Dry matter	Crude protein	Crude fiber	Ether extract	Ash	NDF	ADF
Fennel	91.94	18.38	28.20	7.28	11.69	52.37	22.97
Black seed	95.49	22.23	21.47	28.65	4.17	53.55	26.16

اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار کل: اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار کل با دستگاه مارخام و با استفاده از بافر اگزالات (مخلوط اسید اگزالیک پنج درصد و اگزالات پتاسیم ۱۰ درصد) و تیتر کردن محلول به‌دست‌آمده با سود ۰/۰۱ نرمال انجام شد (Barnett and Reid, 1957). غلظت کل اسیدهای چرب فرار با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

غلظت کل اسیدهای چرب فرار (میلی-مول بر لیتر) $=\frac{A\times 0.01}{B}\times 1000$

که در آن، A= حجم سود مصرفی (میلی‌لیتر) و B= حجم نمونه مایع انکوباسیون مصرفی (میلی‌لیتر).

اندازه‌گیری قابلیت هضم ماده آزمایشی: در آزمایش درون-تنی، مقدار مدفوع دفع شده گوسفندان با استفاده از نصب توری‌هایی در زیر قفس دام‌ها صورت گرفت. بعد از جمع-آوری مقدار کل مدفوع و ثبت آن، ۲۰۰ گرم از آن به منظور تعیین ماده خشک و ترکیب شیمیایی به آزمایشگاه تغذیه دام منتقل شد. به منظور تعیین قابلیت هضمی مواد خوراکی و مواد مغذی آن‌ها، ابتدا مقدار خورده شده از تفاضل مقدار خوراک باقیمانده از خوراک داده شده (بر حسب ماده خشک) محاسبه شد و سپس ضریب قابلیت هضمی با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد:

$$\frac{(FNM\times DMI)-(SNM\times SMI)}{FNM\times DMI}$$

که در آن، FNM= درصد ماده مغذی خوراک، DMI: ماده خشک مصرفی، SNM= درصد ماده مغذی مدفوع و SMI= ماده خشک مدفوع.

در آزمایش برون‌تنی، شیرابه شکمبه به مدت ۴۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رونشست جداسازی و لوله‌های فالکن حاوی بقایای هضم نشده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از گذشت این زمان، وزن بقایای خشک شده درون فالکن ثبت شد و محتویات آن به مدت یک ساعت در محلول شوینده خنثی جوشانده شد، سپس با استفاده از کروسیبل روزنه‌دار صاف شد و کروسیبل‌ها به آون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، کروسیبل‌ها به دسیکاتور منتقل و بعد از سرد شدن، وزن آن‌ها ثبت شد. به منظور اندازه‌گیری قابلیت هضم حقیقی، وزن خاکستر نمونه‌ها با قرار دادن کروسیبل‌های حاوی محتویات خشک شده در کوره الکتریکی در دمای ۶۰۰ درجه سلسیوس محاسبه شد. با کسر مقدار خاکستر و مقدار ماده آلی تجزیه نشده از وزن ماده آلی در هر بطری و بر اساس رابطه زیر محاسبه شد (Verco *et al*., 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) است. همچنین میزان ضریب تفکیک‌پذیری (PF) و توده میکروبی (MM) مطابق با روابط پیشنهاد شده به وسیله Blummel *et al.* (1997) محاسبه شد:

$$MM\ (mg)=[c-(a-b)]-[NGml\times 2.2]$$
$$PF=OMDe/IVGP=c-(a-b)/IVGP$$

در این روابط، NG= میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی، 2.2= ضریب استوکیومتری و IVGP= گاز تولیدی طی ۲۴ ساعت است.

شمارش پروتوزوآ: شمارش پروتوزوآ بر اساس روش Dehority (2003) انجام شد. سه زیر خانواده انتودینینه، اُفریوایکلوسینیه و دیپلودینینه و خانواده ایزوتریشیدا در زیر میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی X_{10} و از راه کاربرد نرم افزار دینوکاپچر شناسایی و شمارش شدند.

تجزیه داده‌ها: تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ صورت گرفت. نرمال بودن داده‌های شمارشی (جمعیت پروتوزوآ) ابتدا با آزمون ناپارامتری کولموگوروف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت و سپس تجزیه انجام شد. طرح آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش، طرح کاملاً تصادفی بود و برای آزمایش اول به-صورت اندازه‌گیری‌های تکرار شده در زمان بود. از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول (درون‌تنی): اثر رازیانه و سیاه‌دانه بر فراسنجه-های تخمیر شکمبه بره‌های پرواری در طول دوره آزمایش درون‌تنی در جدول ۳ نشان داده شده است. تیمارها اثری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه نداشتند ($P>0/05$)، اما میزان ماده آلی تجزیه شده در شکمبه تحت تأثیر رازیانه، افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشت ($P<0/05$). آثار تیمارها بر غلظت اسید چرب کل در شکمبه و pH طی زمان دارای تغییرات معنی‌داری بود، به‌طوری که در روز ۳۰ آزمایش، pH در هر دو گروه تیمار شده با گیاه دارویی کمتر از شاهد بود (شکل ۱). همچنین اسیدهای چرب کل در روز ۳۰ در گروه سیاه‌دانه نسبت به شاهد و در روز ۶۰ در گروه

رازیانه، نسبت به شاهد و سیاه‌دانه افزایش چشمگیری داشت (P<۰/۰۵، شکل ۲).

در واقع، اسیدهای چرب فرار در شکمبه از تجزیه اسیدهای چرب و آزادسازی پروتون آن‌ها ایجاد می‌شوند و pH شکمبه را کاهش می‌دهند (Penner *et al*., 2009). گزارش شده است که رابطه معکوسی بین غلظت اسیدهای چرب و pH شکمبه وجود دارد (Allen, 1997) و pH پایین در شکمبه با تغییرات تولید اسیدهای چرب مرتبط است (Spanghero *et al*., 2008). اسیدیته شکمبه شاخص مهمی از عملکرد اکوسیستم شکمبه است (Zhou *et al*., 2012). در تخمین pH شکمبه، مولکول‌های افزودنی‌های گیاهی نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Spanghero *et al*., 2008). در این مطالعه، کاهش pH مایع شکمبه در روز ۳۰ آزمایش در تیمارهای رازیانه و سیاه‌دانه همراه با افزایش اسیدهای چرب کل تولیدی در این زمان بود. گزارش شده است که سطح ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس رازیانه سبب کاهش معنی‌دار pH شکمبه شد (Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2019). نتایج آزمایش‌ها و مطالعات متعدد نشان داده است که اثر گیاهان دارویی، اسانس یا عصاره آن‌ها بر میزان نیتروژن آمونیاکی شکمبه از روند خاصی پیروی نمی‌کند. به عنوان مثال، افزودن اسانس پونه کوهی در شرایط برون‌تنی (کارواکرول جزء اصلی اسانس آن است) باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شد (Busquet *et al*., 2006)، درحالی که در مطالعه دیگر، اثر ساپونین بر جمعیت میکروبی و تخمیر شکمبه، افزایش این فراسنجه را نشان داد (Patra and Saxena, 2009). اما همانند مطالعه حاضر، مخلوط اسانس‌ها تأثیری بر تولید نیتروژن آمونیاکی در شکمبه گوسفندان تغذیه شده با جیره غنی از پروتئین نداشت (Castillejose *et al*., 2007). در یک مطالعه دیگر نیز تغییری در میزان نیتروژن آمونیاکی شکمبه در اثر افزودن اسانس رازیانه مشاهده نشد (Jahani-Azizabadi *et al*., 2014).

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود رازیانه سبب افزایش معنی‌دار قابلیت هضم ماده آلی شد، درحالی که اثر افزایشی سیاه‌دانه در این رابطه، معنی‌دار نشد. مشابه با نتایج حاضر، افزایش قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی با افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر اسانس رازیانه به ۷۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری شده در آزمایشگاه گزارش شده است (Sallam *et al*., 2009). محققان پیشنهاد کردند که ممکن است اجتماع میکروبی پیچیده شکمبه بر نحوه عمل متابولیت‌های ثانویه زیستی فعال موجود در خوراک اثر بگذارد و همین امر، دلیل نتایج متفاوت به‌دست آمده در مطالعات مختلف است (Miri *et al*., 2015). همچنین نوع و میزان اثر گیاهان دارویی به تناسب نوع و غلظت ماده مؤثر موجود در آن‌ها متفاوت است و مقدار ماده مؤثر تحت تأثیر عواملی مانند نور و حرارت قرار دارد که سبب می‌شود حتی یک‌گونه گیاه دارویی که در محیط‌های متفاوت رشد کرده دارای مقادیر متفاوتی از مواد مؤثر باشد (Dudareva *et al*., 2004).

جدول ۳- اثر رازیانه و سیاه‌دانه بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه بره‌های پرواری طی دوره آزمایشی (میانگین ± خطای استاندارد)

Table 3. Effect of *Foeniculum vulgare* and *Nigella sativa* on rumen fermentation parameters of fattening lambs during experimental period (mean ± SEM)

Parameter	Treatment			Time (day)			*P*-value		
	Control	Fennel	Black seed	0	30	60	Treat	Time	Treat × Time
Total fatty acids (mmol/L)	45.73±2.04	50.92±2.04	48.22±2.04	47.78±2.04^{ab}	51.95±2.04^{a}	44.14±2.04^{b}	0.24	0.04	0.02
Ammonia nitrogen (mg/L)	104.91±7.29	106.67±7.29	121.36±7.29	109.18±7.05	118.94±7.05	104.86±7.05	0.25	0.35	0.20
pH	6.46±0.04	6.33±0.04	6.24±0.04	6.58±.04^{a}	6.24±0.04^{b}	6.30±0.04^{b}	0.07	<0.0001	0.02
Organic matter digestibility (mg)	50.10±1.80	49.46±1.80	49.38±1.80	49.38±1.60	50.01±1.60	50.612±1.60	0.98	0.28	0.49

[a-b] Different superscript letters in the same row indicate significant difference (*P*<0.05).

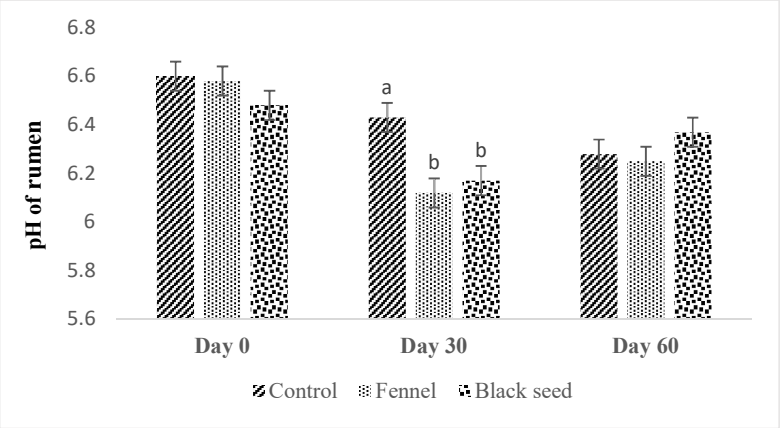

Fig. 1. Effect of *Foeniculum vulgare* and *Nigella sativa* on rumen pH during experimental period (mean ± SEM)

شکل ۱- اثر رازیانه و سیاه‌دانه بر pH شکمبه طی دوره آزمایشی (میانگین ± خطای استاندارد)

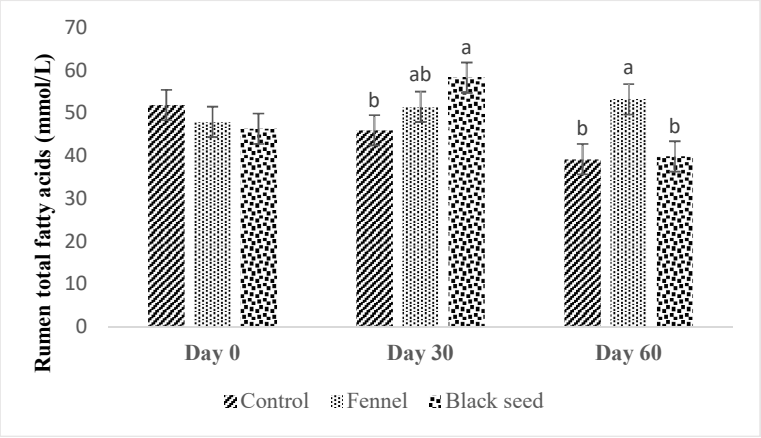

Fig. 2. Effect of *Foeniculum vulgare* and *Nigella sativa* on rumen total fatty acids concentration during experimental period (mean ± SEM)

شکل ۲- اثر رازیانه و سیاه‌دانه بر غلظت اسیدهای چرب کل شکمبه طی دوره آزمایشی (میانگین ± خطای استاندارد)

اثر رازیانه و سیاه‌دانه بر جمعیت پروتوزوا: همه جمعیت‌های پروتوزوایی مطالعه شده در گروه‌های تیمار شده با رازیانه و سیاه‌دانه کاهش یافت ($P<0/05$، جدول ۴). ساز و کارهای احتمالی زیادی برای اثر اسانس‌ها بر جمعیت پروتوزوا ارائه شده است مانند از بین رفتن محتوای سلولی یا لیز شدن سلول (Benchaar *et al*., 2008). کاهش تولید گاز متان به خاطر کاهش عرضه هیدروژن به باکتری‌های متانوژن نیز گزارش شده است (Nooriyan Soroor and Rouzbehan, 2017). در واقع، احتمال داده شده است که ترکیبات فعال گیاهان دارویی (مانند آنتول در رازیانه یا تیموکوئینون در سیاه‌دانه) از راه ایجاد پیوند با استرول غشای تک‌یاختگان سبب تغییر نفوذپذیری یاخته شده که در نهایت باعث تجزیه یاخته‌ای تک‌یاختگان می‌شود (Benchaar *et al*., 2008). در توافق با نتایج حاضر، محققین کاهش جمعیت دیپلودینیوم را با افزودن پودر دانه رازیانه (هشت گرم) به محیط تخمیر در شرایط آزمایشگاهی مشاهده کردند (Derakhshan Nia *et al*., 2017). محققان کاهش در جمعیت پروتوزوای کل، زیر خانواده افریواسکالکس و خانواده ایزوتریشیا را در اثر افزودن اسانس اکالیپتوس و کاهش جمعیت پروتوزوای کل و زیر خانواده دیپلودینیه و خانواده ایزوتریشیا را در اثر افزودن اسانس گلپر گزارش کردند (Nooriyan Soroor and Rouzbehan, 2017). همچنین نشان داده شده است که اسانس آویشن شیرازی، جمعیت انتودینیوم‌ها را کاهش می‌دهد (Talebzadeh *et al*., 2012).

جدول ۴- اثر رازیانه و سیاه‌دانه بر جمعیت پروتوزوآی شکمبه بره‌های پرواری طی دوره آزمایشی ($N\times10^4$) (میانگین ± خطای استاندارد)

Table 4. Effect of *Foeniculum vulgare* and *Nigella sativa* on protozoa population of fattening lambs during experimental period ($N\times10^4$, mean ± SEM)

Parameter	Treatment			Time (day)			*P*-value		
	Control	Fennel	Black seed	0	30	60	Treat	Time	Treat × Time
Total protozoa	86.22±1.74[a]	40.83±1.74[b]	47.66±1.74[b]	61.89±1.46[a]	56.00±1.46[b]	56.22±1.46[b]	<0.0001	0.01	0.39
Entodinium spp.	48.22±1.57[a]	22.16±1.57[b]	25.16±1.57[b]	32.77±1.32	30.94±1.32	31.83±1.32	<0.0001	0.55	0.83
Isotricha spp.	12.33±0.57[a]	6.94±0.57[c]	8.88±0.57[b]	10.83±0.57[a]	9.50±0.57[b]	7.82±.57[b]	<0.0001	0.00	0.26
Diplodiniinae	12.89±0.56[a]	6.00±0.56[b]	7.33±0.56[b]	8.83±0.59	7.61±0.59	8.33±0.59	<0.0001	0.23	0.59
Ophryoscolecinae	12.77±0.74[a]	5.72±0.74[b]	6.28±0.74[b]	8.83±0.49	79.94±0.49	9.44±0.49	<0.0001	0.07	0.15

[a-b] Different superscript letters in the same row indicate significant difference ($P<0.05$).

آزمایش دوم (برون‌تنی): در آزمایش دوم، اثر سطوح مختلف گیاه رازیانه و سیاه‌دانه بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه به روش برون‌تنی بررسی و نتایج در جداول ۵ و ۶ ارائه شده است. تجزیه اطلاعات به‌دست آمده نشان داد که افزودن دانه رازیانه به محیط تخمیر در شرایط آزمایشگاهی سبب کاهش قابل توجهی در تولید گاز بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (P<۰/۰۰۰۱، جدول ۵). به‌طوری که با افزایش سطح گیاه، کاهش در تولید گاز بیشتر بود و کمترین میزان گاز تولیدی در سطح ۵۰ میلی‌گرم رازیانه ثبت شد. میزان ماده آلی تجزیه شده و همچنین مقدار توده میکروبی در سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم رازیانه در مقایسه با سطح صفر (شاهد) کمتر بود (P<۰/۰۵)، اما اختلاف معنی‌داری در غلظت کل اسیدهای چرب فرار تولیدی، pH و همچنین ضریب تفکیک‌پذیری در بین سطوح مختلف رازیانه با شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵). غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه تنها در سطح ۵۰ میلی‌گرم تحت تأثیر قرار گرفت و افزایش یافت (P>۰/۰۱)، در حالی که تفاوت سطوح دیگر آن با شاهد از لحاظ آماری غیرمعنی‌دار بود. اثر سطوح مختلف سیاه‌دانه بر برخی فراسنجه‌های تخمیر شکمبه در جدول ۶ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در میزان گاز تولیدی طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد، به‌طوری که سطوح ۵ و ۵۰ میلی‌گرم سیاه‌دانه به ترتیب باعث کاهش و افزایش معنی‌دار مقدار این فراسنجه شدند (P<۰/۰۰۰۱). میزان نیتروژن آمونیاکی تولید شده در محیط تخمیر در همه سطوح کاهش یافت (P<۰/۰۰۰۱)، هر چند تفاوتی بین سطوح مختلف با یکدیگر مشاهده نشد. سطوح مختلف سیاه‌دانه در این مطالعه اثری بر غلظت اسیدهای چرب فرار کل، میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده، ضریب تفکیک‌پذیری و همچنین pH مایع شکمبه انکوبه شده نسبت به شاهد اعمال نکرد (P>۰/۰۵). تولید گاز عموماً برای پیش‌بینی مصرف ماده خشک مورد استفاده قرار می‌گیرد و بر این اساس، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین مصرف ماده خشک و تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی و الیاف حاصل از شوینده خنثی وجود دارد (Blummel *et al*., 1997). با توجه به این که بخشی از تولید گاز از راه تولید اسیدهای چرب در شکمبه تولید می‌شود، تولید گاز می‌تواند نشان‌دهنده تخمیر کربوهیدرات‌های خوراک باشد (Blummel and Orskov, 1993). برخی محققین، کاهش گاز تولیدی کل را به کاهش قابلیت هضم ماده خشک مربوط دانستند (Tan *et al*., 2011). در مورد اثر گیاهان دارویی بر تولید گاز، گزارش‌های متعدد و نتایج متغیری ارائه شده است. در بیشتر مطالعات، کاهش و در برخی عدم تغییر یا افزایش در آن را به واسطه گنجاندن گیاهان دارویی به جیره نشخوارکنندگان گزارش نموده‌اند. کاهش تولید گاز می‌تواند به دلیل خاصیت ضدمیکروبی گیاه دارویی، عصاره یا اسانس آن باشد که با اثرگذاری بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها از تولید گاز جلوگیری می‌کند. به عبارت دیگر، کاهش گاز تولیدی می‌تواند بر اثر کاهش فرآیند تخمیر و کاهش تجزیه ماده آلی باشد که در نهایت منجر به کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و کاهش انرژی قابل سوخت و ساز می‌شود. در مورد افزایش گاز تولیدی در اثر استفاده از گیاهان دارویی، عصاره‌ها، اسانس‌ها و ترکیبات فعال آن‌ها پیشنهاد شده است که برخی از اجزای اسانس‌ها به عنوان منبع کربن به وسیله میکروارگانیسم‌های شکمبه استفاده می‌شوند که

باعث تولید گاز ۲۴ ساعته بالاتر می‌شود (Yadeghari *et al*., 2013). در مطالعه حاضر، همه سطوح رازیانه و سطح پنج میلی‌گرم سیاه‌دانه سبب کاهش تولید گاز شد. هماهنگ با این نتایج، محققان در بررسی اثر سطوح مختلف اسانس رازیانه بر فراسنجه‌های تولید گاز و جمعیت پروتوزوآی شکمبه بز در شرایط برون تنی، کاهش در تولید گاز را گزارش کردند (Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2019). همچنین، بررسی آثار روغن اسانس گیاهان دارویی آویشن شیرازی، اکالیپتوس و رازیانه و مخلوط‌هایی از اسانس این گیاهان روی فراسنجه‌های تخمیر شکمبه بز و تولید گاز متان در شرایط برون‌تنی، کاهش قابل توجه در تولید گاز را نشان داد (Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2014). کاهش میزان تولید گاز در جیره حاوی اسانس آویشن شیرازی می‌تواند به فعالیت ضدمیکروبی مواد مؤثره این گیاه مربوط باشد که با اثر بر فعالیت جمعیت میکروبی شکمبه باعث کاهش فعالیت‌های هضمی و کاهش قابلیت هضم ظاهری ماده خشک می‌شود (Mohammadizad *et al*., 2015)، اما سیاه‌دانه در سطوح بالا سبب افزایش میزان گاز تولیدی از محیط تخمیر شد که در تائید نتایج مطالعه حاضر، محققین گزارش کردند که سطوح مختلف اسانس تغییر معنی‌داری در میزان گاز تولیدی ایجاد کردند و تیمار-های ۰/۳۳، ۰/۶۷ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اسانس سیاه‌دانه سبب افزایش تولید گاز شدند (Ghanbari *et al*., 2017). در مطالعه‌ای پیشنهاد شد که مونوترپن‌های هیدروکربنه آلفا پینن، بتا پینن و کامفن (بخشی از ترکیبات سیاه‌دانه را این مونوترپن‌ها تشکیل می‌دهند) در شرایط آزمایشگاهی سبب افزایش تولید گاز و افزایش فعالیت میکروارگانیسم-های شکمبه می‌شوند (Hickon *et al*., 1967).

اسیدهای چرب فرار در نشخوارکنندگان، منبع اصلی انرژی هستند و تغییرات زیاد در میزان آن‌ها مطلوب نیست. آثار اسانس‌های گیاهی و یا ترکیبات آن‌ها بر تخمیر شکمبه و تولید اسیدهای چرب کل ممکن است به ترکیب جیره، شرایط آزمایش و طول دوره سازگاری بستگی داشته باشد (Benchaar *et al*., 2008). در مطالعه حاضر، گیاهان دارویی رازیانه و سیاه‌دانه اثری بر میزان اسید چرب تولیدی در شکمبه اعمال نکردند. در مطالعه برون‌تنی، ۵۷/۳ میلی‌گرم سیاه‌دانه آسیاب شده در ۱۴۲/۷ میلی‌گرم خوراک پایه سبب افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار کل شد (Nemati Shirzai *et al*., 2012). در مطالعه دیگر، تغییری در غلظت اسیدهای چرب کل شکمبه با استفاده از مقادیر مختلف سینامالدئید مشاهده نشد، اما تغییراتی در غلظت اسیدهای چرب استات، پروپیونات و بوتیرات بسته به سطح استفاده شده ایجاد شد، به‌طوری که این آثار در سطوح بالاتر برجسته‌تر بود (Busquet *et al*., 2005). به هر حال، گیاهان دارویی و مواد مؤثره موجود در آن‌ها می‌توانند آثار متفاوتی بر تولید اسیدهای چرب فرار اعمال کنند.

در این مطالعه، غلظت نیتروژن آمونیاکی در همه سطوح سیاه‌دانه و در سطح ۵۰ میلی‌گرم رازیانه، کاهش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشت ($P<0/05$). نشان داده شده است که گیاهان دارویی و ترکیبات موجود در آن‌ها با مهار کردن پروتئاز باکتریایی سبب کاهش هضم پروتئین و غلظت آمونیاک شکمبه شده و در نهایت موجب انتقال و هضم آن‌ها در روده می‌شوند (Wang *et al*., 1997). پیشنهاد شده است که کارواکرول و تیمول از راه آسیب به غشای سلول و اختلال در عملکرد نیروی محرک پروتون-سدیم سبب مهار باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک می‌شوند و غلظت نیتروژن آمونیاکی کاهش می‌یابد (Burt, 2004). پیشنهاد شده است که کاهش غلظت آمونیاک در شکمبه به دلیل افزایش تولید پروتئین میکروبی و یا کاهش تجزیه پروتئین خوراک است (Wallace *et al*., 1994). گزارش شده است که برخی مواد موجود در گیاهان دارویی سبب مهار یا کاهش دآمیناسیون اسیدهای آمینه می‌شوند و از این راه سبب کاهش غلظت نیتروژن در شکمبه می‌شوند (Chizzola *et al*., 2004; Castillejos *et al*., 2007). پروتوزواها به همراه باکتری‌های پروتئولایتکی (باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک با توان زیاد) مهم‌ترین تولیدکنندگان نیتروژن آمونیاکی در شکمبه هستند، بنابراین گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها با داشتن اثر بازدارندگی بر جمعیت این میکروارگانیسم‌ها سبب کاهش تولید آمونیاک می‌شوند (Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2014)، همچنان که در مطالعه حاضر، کاهش در نیتروژن شکمبه همسو با کاهش جمعیت پروتوزوایی بود. احتمالاً اثر کاهندگی گیاهان دارویی مورد مطالعه در این تحقیق بر نیتروژن آمونیاکی شکمبه هم به آثار ترکیبات فعال سیاه‌دانه (تیموکوئینون، پی‌سیمن، کارواکرول، تیمول و...) و رازیانه (آنتول، فنچون، لیمونن و ...) مربوط باشد.

مطابق با نتایج تحقیق حاضر، افزودن سطوح مختلف اسانس آویشن شیرازی و اکالیپتوس و مخلوط آن‌ها و همچنین

افزودن اسانس رازیانه تا سطح ۷۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اثری بر pH مایع شکمبه در بعد از گرمخانه‌گذاری نداشت (Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2019). همچنین افزودن اسانس رازیانه به جیره، تأثیری بر pH شکمبه گوسفندان قزل نداشت (Khodabakhshi *et al*., 2014).

ماده آلی تجزیه شده به واسطه افزودن همه سطوح رازیانه و سطوح کم سیاه‌دانه کاهش یافت. مشابه با نتایج حاضر، نشان داده شده است که گیاهان دارویی یا مواد مؤثره آن‌ها باعث کاهش قابلیت هضم می‌شوند (Garcia-Gonzalez *et al*., 2005). با این حال در مطالعه دیگری، میزان ۰/۶۷ گرم در لیتر مایع شکمبه سیاه‌دانه باعث افزایش ماده آلی هضم شده حقیقی نسبت به سایر تیمارها (سطوح صفر، ۰/۳۳ و ۱ گرم در لیتر) شد (Ghanbari *et al*., 2017). برخی محققین پیشنهاد نمودند کاهش در هضم خوراک می‌تواند به دلیل کاهش فعالیت باکتریایی و آنزیمی تحت تأثیر ترکیبات مؤثر این گیاهان باشد (Patra *et al*., 2006). در همین رابطه، محققان نشان دادند که افزودن اسانس به محیط تخمیر، قابلیت هضم کربوهیدرات‌های ساختمانی را کاهش داده و اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های سلولایتیک یا قارچ‌های شکمبه‌ای دارد. ضریب تفکیک‌پذیری نشان‌دهنده بخشی از سوبسترا است که به‌جای تولید گاز، در تولید پروتئین میکروبی استفاده شده است (Blummel *et al*., 1997). به بیان دیگر، هر چه عامل ضریب تفکیک‌پذیری بالاتر باشد نشان‌دهنده بهبود راندمان تخمیر است. محققان دریافتند که افزودن یک یا دو درصد سیاه‌دانه به جیره گوسفند سبب بهبود مقادیر قابل هضم شد (Zanouny *et al*., 2013). اما در این مطالعه، آثار رازیانه و سیاه‌دانه بر این شاخص معنی‌دار نشد. مشابه با نتایج مطالعه حاضر در مورد اثر سیاه‌دانه بر توده میکروبی، اثر معنی‌داری از سطوح مختلف تفاله مرزه بر تولید توده میکروبی و بازده تولید میکروبی مشاهده نشد (Noshadi *et al*., 2014). در مطالعه دیگری، اسانس رازیانه موجب افزایش راندمان توده میکروبی شده است که شاید علت این تفاوت به دلیل آثار متفاوت اسانس نسبت به خود گیاه بر این فراسنجه باشد (Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2019).

جدول ۵- اثر سطوح مختلف رازیانه بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه

Table 5. Effect of different levels of fennel on rumen fermentation parameters

Parameter	Fennel (mg)				SEM	*P*-value
	0	5	25	50		
GP24 mL/g OMD	44.40[a]	35.80[b]	27.40[c]	17.80[d]	5.03	<0.0001
Total volatile fatty acids (mmol/L)	50.13	50.82	40.72	49.36	1.75	0.13
Ammonia nitrogen (mg/L)	149.36[a]	157.59[a]	142.32[a]	116.32[b]	4.53	0.001
pH	6.63	6.52	6.64	6.40	0.06	0.55
Organic matter digestibility (mg)	34.14[a]	29.69[a]	22.42[b]	14.53[c]	1.74	<0.0001
Partitioning factor	3.84	4.16	4.10	4.08	0.07	0.50
Microbial biomass (mg)	73.02[a]	69.69[a]	51.92[b]	23.51[c]	4.08	<0.0001

[a-c] Different superscript letters in the same row indicate significant difference (P<0.05).

جدول ۶- اثر سطوح مختلف سیاه‌دانه بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه

Table 6. Effect of different levels of black seed on rumen fermentation parameters

Parameter	Black seed (mg)				SEM	*P*-value
	0	5	25	50		
GP24 mL/g OMD	44.40[b]	36.20[c]	41.60[b]	47.80[a]	4.96	<0.0001
Total volatile fatty acids (mmol/L)	50.13	46.92	49.94	57.68	1.67	0.13
Ammonia nitrogen (mg/L)	149.36[a]	104.47[b]	117.28[b]	107.91[b]	4.66	<0.0001
pH	6.63	6.63	6.61	6.54	0.05	0.92
Organic matter digestibility (mg)	34.14[ab]	28.69[bc]	27.79[c]	35.61[a]	1.89	0.02
Partitioning factor	3.84	3.48	3.90	3.72	0.31	0.43
Microbial biomass (mg)	73.02[a]	51.96	59.32	72.94	5.29	0.78

[a-c] Different superscript letters in the same row indicate significant difference (P<0.05).

اثر رازیانه و سیاه‌دانه بر جمعیت پروتوزوا به روش برون‌تنی: بر اساس اطلاعات ارائه شده در جدول ۷، جمعیت پروتوزوای کل و زیرخانواده انتودینینه کاهش چشمگیری داشت، به‌طوری که این کاهش در سطوح بالاتر بیشتر بود ($P<۰/۰۰۰۱$)، اما سطوح استفاده شده این گیاه در مطالعه حاضر بر جمعیت خانوادهٔ ایزوتریشیدا و زیرخانواده‌های دیپلودینینه و افریواسکالکس اثری نداشت ($P>۰/۰۵$). اثر سطوح مختلف سیاه‌دانه بر جمعیت پروتوزوا نیز در جدول ۸ نشان داده شده است. تعداد پروتوزوای کل و انتودینینه تحت تأثیر افزودن سطوح ۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی-لیتر سیاه‌دانه نسبت به سطح شاهد کاهش یافت ($P<۰/۰۰۰۱$)، اما جمعیت خانواده (ایزوتریشیدا) و زیرخانواده (دیپلودینینه و افریواسکالکس) مطالعه شده تحت تأثیر قرار نگرفت ($P>۰/۰۵$). در یک مطالعه، با مشاهده کاهش جمعیت پروتوزوایی مایع شکمبه بز، آثار آنتی پروتوزوآیی اسانس‌های آویشن شیرازی، اکالیپتوس و رازیانه به ساختار فنولی ترکیبات فعال اصلی منتسب شد (Mirzaei Cheshmehgachi *et al*., 2014)، زیرا نشان داده شده است که ساختارهای فنولی می‌تواند 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). آثار گیاهان و اجزای اصلی آن‌ها بر جمعیت پروتوزوا متناقض و وابسته به مقدار مصرف گزارش شده است.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این مطالعه، استفاده از ۲۰ گرم در کیلوگرم دانه رازیانه و سیاه‌دانه در جیره بره‌های پرواری سنجابی، آثار ضدپروتوزوایی دارد. در شرایط آزمایشگاهی، رازیانه و سطح پنج میلی‌گرم در کیلوگرم سیاه‌دانه سبب کاهش تولید گاز شد، اما سطح ۵۰ میلی‌گرم سیاه‌دانه سبب افزایش تولید گاز بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. همچنین دانه رازیانه در شرایط آزمایشگاهی (سطوح بالا) سبب کاهش میزان ماده آلی تجزیه شد، اما سطوح پایین رازیانه با تأثیر بر روند تخمیر شکمبه و کاهش تولید گاز می‌تواند سبب بهبود بازدهی تخمیر از راه افزایش ماده آلی تجزیه شده شود. دانه رازیانه و سیاه‌دانه در شرایط برون‌تنی، آثار ضدپروتوزوایی انتخابی علیه زیرخانواده انتودینینه اعمال کردند. همچنین نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد گیاهان دارویی رازیانه و سیاه‌دانه دارای پتانسیل دست‌کاری و تغییر روند تخمیر شکمبه هستند و آثار ضدپروتوزوایی آن‌ها در هر دو آزمایش، مشهود و قابل توجه بود. با این‌حال، آثار این گیاهان بر روند تخمیر در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی در بیشتر فراسنجه‌های تخمیری از روند یکسانی پیروی نمی‌کند و نمی‌توان آثار برون‌تنی را به‌صورت کامل و با اطمینان به شرایط درون شکمبه گوسفند زنده تعمیم داد. اگرچه برای حصول نتایج بیشتر به تحقیقات بیشتری با سطوح مختلف از این گیاهان دارویی نیاز است.

جدول ۷- اثر سطوح مختلف رازیانه بر جمعیت پروتوزوا ($\times۱۰^۴$)

Table 7. Effect of different levels of fennel on protozoa population ($N\times10^4$)

Parameter	Fennel (mg)				SEM	*P*-value
	0	5	25	50		
Total protozoa	30.20[a]	16.00[b]	9.80[c]	6.40[c]	2.21	<0.0001
Entodinium spp.	28.00[a]	13.40[b]	8.40[c]	5.80[c]	2.07	<0.0001
Isotricha spp.	0.40	0.60	0.60	0.20	0.15	0.79
Diplodiniinae	1.00	0.60	0.40	0.40	0.16	0.58
Ophryoscolecinae	0.80[ab]	1.40[a]	0.40[b]	0.00[b]	0.16	0.01

[a-c] Different superscript letters in the same row indicate significant difference ($P<0.05$).

جدول ۸- اثر سطوح مختلف سیاه‌دانه بر جمعیت پروتوزوا ($\times۱۰^۴$)

Table 8. Effect of different levels of black seed on protozoa population ($N\times10^4$)

Parameter	Black seed (mg)				SEM	*P*-value
	0	5	25	50		
Total protozoa	30.20[a]	16.40[b]	12.80[b]	7.60[c]	2.06	<0.0001
Entodinium spp.	28.00[a]	14.20[b]	11.40[b]	6.40[c]	1.94	<0.0001
Isotricha spp.	0.40	0.80	0.40	0.40	0.13	0.68
Diplodiniinae	1.00	1.00	0.60	0.60	0.17	0.74
Ophryoscolecinae	0.80	0.40	0.40	0.20	0.15	0.60

[a-c] Different superscript letters in the same row indicate significant difference ($P<0.05$).

فهرست منابع

Aboul-fotouh, G. E., Allam, S. M., Shehat, E., & Abdel-Azeem, S. N. (1999). Effect of some medicinal plants as feed additives on performance of growing sheep. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, *2*, 79-87.

Babayan, V. K., Kootungal, D., & Halaby, G. A. (1997). Proximate analysis, fatty acid and, amino acid composition of (*Nigella sativa*) seed. *Journal of Food Science*, *43*(4), 1314-1317.

Barnett, A. J. G., & Reid, R. L. (1957). Studies on production of volatile fatty acids from grass by rumen liquid in an artificial rumen. *Journal of Agriculture Science, 48*, 315-321.

Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology, 145*, 209-228. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014

Blummel, M., & Ørskov, E. R. (1993). Comparison of gas production and nylon bag degrade ability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, *40,* 109-119.

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

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

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology, 94*, 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, *89*, 761-771. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72137-3

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Losa, R. (2007). Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology, 132*, 186-201. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.03.023

Cherif, M., Ben Salem, H., & Abidi, S. (2018). Effect of the addition of Nigella sativa seeds to low or high concentrate diets on intake, digestion, blood metabolites, growth and carcass traits of Barbarine lamb. *Small Ruminant Research*. *158*, 1-8. doi: 10.1016/j.smallrumres.2017.11.008

Chizzola, R., Hochsteiner, W., & Hajek, S. (2004). GC analysis of essential oils in the rumen fluid after incubation of Thuja orientalis twigs in the Rusitec system. *Research in Veterinary Science 76*, 77-82. doi: 10.1016/j.rvsc.2003.07.001

Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants." New York: Columbia University Press. 352 p.

Dehority, B. A. (1993). Laboratory Manual for Classification and Morphology of Rumen Ciliate Protozoa. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Derakhshan, N. S., Azarfar, A., Azizi, A., & Taghizadeh, M. (2017). Effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) and cumin (*Carum carvi*) powder and Saccharomyces cerevisiae in comparison with monensin on *in vitro* gas production parameters, protozoa population and microbial enzyme activity of sheep. *Iranian Journal of Animal Science*, *48*(3), 399-410. [In Persian]

Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, *135*, 1893-1902. doi: 10.1201/9780429455612

Galyean, M. L., Perino, L. J., & Duff, G. C. (1999). Interaction of cattle health/ immunity and nutrition. *Journal of Animal Science, 77*, 1120-1134.

Garcýa-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M., & Gonzalez, J. S. (2008). Dose response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production *in vitro. Animal Feed Science and Technology, 145*, 319-334. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.05.040

Ghanbari, N., Abdi, E., Besharati, M., & Asghari, R. (2017). Effects of different levels of black cumin essential oil on sheep partitioning factor, metabolizable energy and digestible organic matter *in vitro*. 1st International and 5th National Conference on Organic vs. Conventional Agriculture, Ardebil, Iran.

Goel, G., Puniya, A. K., Aguliar, C. N., & Singh, K. (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Natur wissenschaften*, *92*, 497-503.

Goreja, W. G. (2003). Black Seed: Nature's Miracle Remedy. New York, NY7 Amazing Herbs Press, 46 p.

Grieve, M. (1984). Tansy. In: Leyel, C.F. (Ed.), A Modern Herbal. Penguin Books Ltd, Middlesex, Great Britain, pp. 789-790.

Jahani-Azizabadi, H., Danesh Mesgaran, M., Vakili, A., & Rezayazdi, K. (2014). Effect of some plant essential oils on *in vitro* ruminal methane production and on fermentation characteristics of a mid-forage diet. *Journal of Agricultural Science and Technology, 16*, 1543-1554.

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.

Miri, V. H., Ebrahimi, S. H., & Tyagi, A. K. (2015). The effect of cumin (*Cuminum cyminum*) seed extract on the inhibition of PUFA biohydrogenation in the rumen of lactating goats via changes in the activity of rumen

bacteria and linoleate isomerase enzyme. *Small Ruminant. Research, 125*, 56-63. doi: 10.1016/j.smallrumres.2015.02.017

Mirzaei Cheshmehgachi, S., Moeini, M. M., Hozhabri, F., & Nooriyan Soror, M. E. (2019). Effect of different levels of fennel essential oil on *in vitro* gas production parameters and protozoa population of goat rumen. *Animal Production Research, 8*(1), 41-51. doi: 10.22124/AR.2019.10750.1330 [In Persian]

Mirzaei Cheshmehgachi, S., Moeini, M. M., Hozhabri, F., & Nooriyan Soror, M. E. (2014). The effects of three medicinal plant essential oils on goat ruminal fermentation parameters and *in vitro* methane production. MSc Thesis, Razi University.

Mohammadizad, T., Fatahnia, F., Azarfar, A., Khatibjoo, A., & Taasoli, G. (2015). Effect of *Zataria multiflora* essential oils on *in vitro* gas production and rumen fermentation in diets containing different starch sources and fat types. *Journal of Ruminant Research*, *3*(3), 37-58. [In Persian]

Nagaraja, T. G., Newbold, C. J., Van Nevel, C. J., & Demeyer, D. I. (1997). *Manipulation of ruminal fermentation. Pages 523-632 in The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Chapman and Hall, London, UK.

Nemati Shirzai, F., Rozbehan, Y., & Karimi Tarshizi, M. A. (2012). An Investigation of the effect of some medicinal plants on in vitro ruminal fermentation parameters. *Iranian Journal of Animal Science, 43*(2), 193-206. [In Persian]

Nergiz, C., & Otles, S. (1998). Chemical composition of Nigella sativa L. seeds. *Food Chemistry, 48*(3), 259-261.

Nooriyan Soroor, M. E., & Rouzbehan, Y. (2017). Effect of essential oils of Eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill) and Angelica (*Heracleum persicum* Desf. ex Fischer) on *in vitro* ruminal fermentation, protozoal population and methane emission using Afshari sheep inoculum. *Journal of Agricultural Science and Technology, 19*, 553-567.

Noshadi, S, Azarfar, A, Alipour, D, & Khosravinia, H. (2014). Effects of inclusion of dried deoiled Satureja khuzistanica in finishing diet of lambs on kinetics of gas production *in vitro*. *Iranian Journal of Animal Science, 45*(2), 163-171.

NRC. (2007). Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. National Academy Press, Washington, DC, USA.

Odhaib, K. J., Adeyemi, K. D., Ahmed, M. A., Jahromi, M. F., Jusoh, S., Samsudin, A. A., Alimon, A. R., Yaakub, H., & Sazili, A. Q. (2018). Influence of Nigella sativa seeds, Rosmarinus officinalis leaves and their combination on growth performance, immune response and rumen metabolism in Dorper lambs. *Tropical Animal Health and Production*, *50*, 1011-1023. doi: 10.1007/s11250-018-1525-7

Patra, A. K., & Saxena, J. (2009). The effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews, 22*, 204-219. doi: 10.1017/S0954422409990163

Patra, A. K., Kamra, D. N., & 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*, 276-291. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.11.001

Penner, G. B., Aschenbach, J. R., Gabel, G., Rackwitz, R., & Oba, M. (2009). Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep. *Journal of Nutrition, 139*, 1714-1720. doi: 10.3945/jn.109.108506

Renjie, L. L., & Shi Shidi, Z. (2010). GC-MS analysis of fennel essential oil and its effect on microbiology growth in rat's intestine. *African Journal of Microbiology Research, 4*, 1319-1323.

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

Spanghero, M., Zanfi, C., Fabbro, E., Scicutella, N., & Camellini, C. (2008). Effects of a blend of essential oils on some end products of in vitro rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology, 145*, 364-374. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.05.048

Talebzadeh, R., Alipour, D., Saharkhiz, M. J., Azarfar, A., & 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. *Journal of Animal Science, 172*, 115-124. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.11.011

Tan, H. Y., Sieo C. C., Abdullah, N., Liang, J. B., Huang, X. D., & Ho, Y. W. (2011). Effects of condensed tannins from Leucaena on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Journal of Animal Science, 169*, 185-193. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.07.004

Vercoe, E. P., Makkar, H. P. S., & 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., Arthaud, L., & Newbold, C. J. (1994). Influence of Yucca schidigera extract on ruminal ammonia concentration and ruminal micro-organisms. *Applied Environmental Microbiology, 60*, 1762-1767. doi: 10.1128/aem.60.6.1762-1767

Wistuba, T. J., Kegley, E. B., Apple, J. K., and Davis, M. E. (2005). Influence of fish oil supplementation on growth and immune system characteristics of cattle. *Journal of Animal Science, 83*, 1097-1101. doi: 10.2527/2005.8351097x

Yadegari, M., Farahani, G. H. N., & Mosadeghzad, Z. (2012). Biofertilizers effects on quantitative and qualitative yield of Thyme (*Thymus vulgaris*). *African Journal of Agricultural Research, 7*(34), 4716-4723.

Zanouny, A. I., Abd-Elmoty, A. K. I., El–Barody, M. A. A., Sallam, M. T., & Abd El– Hakeam, A. A. (2013). Effect of supplementation with *Nigella Sativa* seeds on some blood metabolites and reproductive performance of Ossimi male lambs, *Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences, 8*(1), 47-56.

Zhou, C. S., Xiao, W. J., Tan Z. L., Salem, A. Z. M., Geng, M. M., Tang, S. X., Wang, M., Han, X. F., & Kang J. H. (2012). Effects of dietary supplementation of tea saponins (*Ilex kudingcha C.J. Tseng*) on ruminal fermentation, digestibility and plasma antioxidant parameters in goats. *Animal Feed Science and Technology*, *176*, 163-169. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.019