DOI: 10.22092/vj.2019.125546.1564
شماره ۱۲۷ تابستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثر عصارهٔ هگزانی استخراج شده از گیاه دارویی کلپوره (*Teucrium polium L.*) بر فعالیت تخمیر شکمبه‌ای میکروارگانیسم‌ها در شرایط *in vitro*

• **محسن کاظمی (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه علوم دامی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام
• **الیاس ابراهیمی خرم‌آبادی**
استادیار گروه علوم دامی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۱۲-۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۳-۱۳
Email: phd1388@gmail.com

چکیده

کلپوره گیاهی از خانوادهٔ نعناعیان بوده که دارای مصارف دارویی فراوانی در طب سنتی بوده ولی اثرات آن بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه‌ای تابحال ناشناخته مانده است. از اینرو این آزمایش با هدف بررسی تأثیر عصارهٔ هگزانی استخراج شده از گیاه کامل کلپوره با دستگاه سوکسله بر برخی فراسنجه‌های تخمیری میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای (شامل باکتری‌ها، پروتوزوآ و قارچ‌ها) و با کمک یک جیرهٔ بالانس شده، در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. عصارهٔ هگزانی کلپوره با نسبت‌های صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ قسمت در میلیون به یک محیط کشت تهیه شده از مایع شکمبهٔ گوسفند و بزاق مصنوعی (با نسبت یک به دو) اضافه و سرانجام برخی فراسنجه‌های تخمیری اندازه‌گیری شدند. با افزایش سطح عصاره از صفر به ۴۵۰ قسمت در میلیون، میزان نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار کل *(TVFA)*، افزایش معنی‌داری (خطی) نسبت به تیمار شاهد نشان دادند ولی سایر موارد شامل *pH*، فراسنجه‌های تولید گاز (گاز ۲۴ و ۴۸ ساعت، پتانسیل و ثابت نرخ تولید گاز)، گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی تغییر ننمودند. ضریب تفکیک‌پذیری *(PF)*، تودهٔ میکروبی تولیدی و بازده تولید تودهٔ میکروبی در سطح ۴۵۰ قسمت در میلیون، از کمترین مقدار برخوردار بودند. نتایج کلی نشان داد که عصارهٔ هگزانی کلپوره قادر است برخی فراسنجه‌های تخمیری را در محیط کشت (مانند افزایش نیتروژن آمونیاکی و *TVFA*)، دستخوش تغییراتی نموده و تا حدودی بهبود بخشد به‌طوری‌که بیشترین این تغییرات در سطح ۴۵۰ قسمت در میلیون عصاره مشاهده گردید. همچنین به‌نظر می‌رسد که سطوح کمتر از ۴۵۰ قسمت در میلیون، قادر به تغییر معنی‌دار پارامترهای تخمیری مورد مطالعه در مقایسه با تیمار شاهد نیستند.

کلمات کلیدی: جیره، شکمبه، محیط کشت، ویژگی‌های تخمیر

Veterinary Researches & Biological Products No 127 pp: 110-120

The effect of hexane-extracted *Teucrium Polium* L. on the ruminal microorganism's fermentation activity using *in vitro* technique

By:Kazemi, M., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Animal Science, Higher Education Complex of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran. and Ibrahimi Khorram Abadi, E., Assistant Professor, Department of Animal Science, Higher Education Complex of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran.

Received: 2019-03-04 **Accepted: 2019-06-03**

Email: phd1388@gmail.com

Teucrium polium L. is a plant from the *Lamiaceae* family which is very important in Folk Medicine, however, its effects on fermentation characteristics are still unknown. In this experiment, the effect of hexane oil extracted of *Teucrium polium* L. by soxhlet device was investigated on some fermentation activities of ruminal microorganism (bacteria, protozoa, and fungi) with a balanced ration, *in vitro*. The hexane extract of *Teucrium polium* L. was added to a culture medium prepared from sheep's rumen fluid and artificial saliva (ratio of 1 to 2) with proportions of 0, 150, 300, and 450 ppm, and some fermentation parameters were finally measured. With an increase in the extract level from 0 to 450 ppm, NH_3-N and total volatile fatty acids (TVFA) showed a significant increase (linear) compared to the control, but other parameters such as pH, gas production parameters (24 and 48 h gas, potential and constant rate of gas production), degradability of dry matter and organic matter were not differ. The partitioning factor (PF), microbial mass yield, and efficiency of microbial mass yield were lowest at 450 ppm. The overall results showed that the hexane extract of *Teucrium polium* L. was able to modify and improve some of the fermentation parameters in the culture medium (e.g. increase in ammonia nitrogen and TVFA. Also, the highest changes were observed at 450 ppm. It also seems that levels of less than 450 ppm are not able to significantly change the studied fermentation parameters compared to control.

Keyword: Culture medium, Fermentation characteristics, Ration, Rumen

مقدمه

تغییر الگوی تخمیر شکمبه، از جمله مهمترین موارد مورد پژوهش در تغذیهٔ نشخوارکنندگان در چند دههٔ اخیر در جهت افزایش تولیدات دامی و یا بهبود فرآیند تخمیر در شکمبه بوده است، از طرفی اگرچه که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان افزایش‌دهنده‌های رشد، منجر به کاهش اتلاف انرژی و نیتروژن خوراک شده ولی در مقابل بدلیل حضور باقیمانده‌های ناشی از مصرف آن‌ها در فرآورده‌های دامی و ایجاد مقاومت در برخی از سویه‌های باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌ها، مصرف آنها رو به کاهش بوده و در عوض بسیاری از گیاهان دارویی که دارای فعالیت‌های ضد میکروبی برای طیف وسیعی از باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها می‌باشند، جایگزین مطمئن و مناسبی برای آنها در صنعت دامپروری شده‌اند (۹).

اغلب گیاهان دارویی دارای فرآورده‌های متابولیتی ثانویه (عمدتاً ترپنوئیدها و فنول‌ها) بوده که در جهت بهبود فرآیند تخمیر و نیز افزایش بازده استفاده از مواد مغذی در نشخوارکنندگان مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین بهبود فرآیند تخمیر در محیط شکمبه که مملو از میکروارگانیسم‌هایی همچون باکتری‌ها، قارچ‌ها و پروتوزوآ می‌باشند، می‌تواند در جهت افزایش بهره‌وری دام و تولیدات آنها مفید و مؤثر باشد. استفاده از گیاهان دارویی در جیره، ممکن است که از طریق کاهش میزان تولید متان یا نیتروژن آمونیاکی، باعث بهبود بازده مصرف انرژی در دام گردند (۷). از طرفی تجزیهٔ مواد خوراکی توسط میکروارگانیسم‌های موجود در شکمبه، سبب تولید اسیدهای چرب فراری همچون اسید استیک، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک و نیز گازهایی همچون CO_2 و CH_4 و یا تودهٔ میکروبی می‌گردد (۶)، به‌طوری‌که گاز متان تولید شده در شکمبه پس از آزادسازی علاوه بر آلودگی محیط زیست و تأثیر بر لایهٔ اوزون، منجر به هدررفت انرژی خام جیره در سطح بین ۱۲-۲ درصد خواهد شد (۱۸). نتایج برخی از مطالعات نشان داده که برخی از گیاهان دارویی می‌توانند منجر به کاهش تولید گاز متان در حیوان زنده شده و متعاقباً باعث بهبود بهره‌وری در دام گردند (۲۲).

کلپوره با نام علمی *Teucrium polium* گیاهی از خانوادهٔ نعناعیان، علفی و پایا به ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر بوده و از ظاهر سفید پنبه‌ای برخوردار بوده که معمولاً در نواحی سنگلاخی و ماسه‌زارهای نواحی مختلف دنیا از جمله ایران قابل رویش می‌باشد (۵۲). این گیاه از زمان بقراط

و جالینوس تجویز دارویی می‌شده و عمده‌ترین بخش‌های دارویی آن، شامل سرشاخه‌های گل‌دار می‌باشد که اثر مقوی و ضد تشنج داشته و مصرف آن برای درمان بیماری‌های دستگاه تناسلی-ادراری و تأخیر یا عدم قاعدگی توصیه شده است (۵۲). همچنین بسیاری از تحقیقات علمی نشان داده که این گیاه از اثرات ضد دیابتی (۵۱)، ضدالتهابی، آنتی اکسیدانتی، ضدتب و ضدمیکروب، ضددرد و آنتی اسپاسمودیك برخوردار می‌باشد (۲۳، ۳۷). در مطالعاتی نشان داده شده است که کلپوره حاوی کافئیک اسید، اکدیستروئید، تانن، ترپنوئید، ساپونین، استرول، فلاونویید و لوکوآنتوسیانین بوده (۵، ۴۳) و همچنین دارای اثرات آنتی باکتریال بوده ولی در عین حال اثر ضدقارچی بارزی ندارد (۳۶). از آنجایی‌که هیچگونه مطالعه‌ای در خصوص اثرات عصارهٔ گیاه کلپوره بر فرآیند تخمیر شکمبه‌ای تابحال انجام نشده است، بنابراین این تحقیق با هدف بررسی اثرات افزودن عصارهٔ هگزانی استخراج شده از گیاه کامل کلپوره بر برخی فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای انجام شد تا اینکه مشخص گردد که آیا این عصاره می‌تواند این فراسنجه‌ها را دستخوش تغییرات مثبت بنماید یا خیر.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ گیاه و عصاره‌گیری

گیاه کلپوره در مرحلهٔ گلدهی در تابستان ۱۳۹۷ از مناطق کوهپایه‌ای بخش کوهسرخ شهرستان کاشمر واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری گردید و پس از انتقال بداخل کیسه های نایلونی، درب آن‌ها بسته و سریعاً به آزمایشگاه مرکزی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام انتقال داده شد. بخشی از نمونه‌ها در داخل آون با دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شده و در ادامه با آسیاب با قطر ۱ میلیمتر، غربال شدند. عصارهٔ هگزانی بخش‌های هوایی این گیاه با دستگاه سوکسله (ساخت شرکت بخشی، ایران) تعیین شد (۲). نمونهٔ عصارهٔ چربی استخراج شده از کلپوره با دستگاه سوکسله، به‌مدت یکساعت در آون با دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا هگزان باقیمانده در نمونهٔ چربی، تبخیر گردد. سپس عصارهٔ چربی حاصله در داخل تیوپ‌های دربدار دو میلی‌لیتری ریخته و تا انجام آزمایشات تکمیلی بیشتر در داخل یخچال با دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد و در محیط بدون نور نگهداری شد.

تهیهٔ محیط کشت تخمیری

در تهیهٔ محیط کشت برای تخمین فراسنجه‌های تولید گاز، از روش منک و استینگاس (۳۵) استفاده شد. برای تهیهٔ مایع شکمبه از دو رأس گوسفند نر بلوچی (۳/۵±۳۰ کیلوگرم) دارای فیستولای شکمبه‌ای و قبل از تغذیهٔ صبحگاهی استفاده شد. نمونهٔ مایع شکمبهٔ گرفته شده بلافاصله با پارچه متقال چهار لایه صاف و سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شد.

مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از یک جیرهٔ از قبل تهیه شده بر اساس NRC (۴۰)، به‌داخل شیشه‌های با حجم ۱۲۰ میلی‌لیتر ریخته شد و در ادامه عصارهٔ هگزانی کلپوره به‌مقدار صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ قسمت در میلیون به شیشه‌ها اضافه گردید. پس از افزودن مایع شکمبه و بزاق مصنوعی (با نسبت یک به دو و با حجم کلی ۳۰ میلی‌لیتر)، بلافاصله درب آن‌ها با درپوش‌های لاستیکی بسته شد و توسط کریمپر، درب‌های آن‌ها پلمپ شده و در حمام آب گرم با دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد برای زمان‌های

شکل ۱-گیاه کلپورهٔ جمع‌آوری شده در مرحلهٔ گلدهی از مناطق کوهپایه‌ای بخش کوهسرخ شهرستان کاشمر

۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوبه شدند. اصول اندازه‌گیری و ثبت تولید گاز بر اساس روش تئودورو و همکاران (۴۸) انجام شد. در این روش، مقدار فشار گاز در زمان‌های توصیه شدهٔ بالا به‌کمک فشارسنج دیجیتالی ثبت و همزمان میزان حجم گاز تولید شده نیز توسط سرنگ اندازه‌گیری و ثبت شد. برای هر تیمار پنج تکرار در نظر گرفته شد. همچنین ۵ شیشه فاقد نمونه و عصارهٔ هگزانی به‌عنوان بلنک (blank) برای تصحیح گاز تولید شده از ذرات قبلی باقیمانده در مایع شکمبه، در نظر گرفته شد. پس از اتمام زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون، بلافاصله درب شیشه‌ها باز و محتوای شیشه‌ها با کمک قیف بوخنر دارای صافی از جنس پارچهٔ پلی استر با قطر ۴۵ میکرون، صاف گردید. در ادامه بلافاصله pH مایع فیلتر شده با کمک pH متر اندازه‌گیری شد. مواد هضم نشدهٔ باقیمانده بر روی پارچهٔ صافی، جمع‌آوری و به‌داخل کروزه‌های از

جدول ۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی جیرهٔ آزمایشی بکار رفته در محیط کشت آزمایشگاهی

اجزاء	مقدار (درصد ماده خشک)
یونجهٔ خشک	۳۰/۳۸
دانهٔ جو آسیاب شده	۲۱/۱۸
دانهٔ ذرت آسیاب شده	۲۱/۱۸
دانهٔ گندم آسیاب شده	۶/۰۰
کنجالهٔ سویا	۷/۹۹
سبوس گندم	۱۰/۵۵
مکمل ویتامینی-مواد معدنی۱	۰/۷۲
نمک	۰/۵۶
جوش شیرین	۰/۸۸
کربنات کلسیم	۰/۵۶
ترکیب شیمیایی	
پروتئین خام (٪)	۱۶/۲
خاکستر (٪)	۷/۶
چربی خام (٪)	۴/۲
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF، ٪)	۲۴/۹
کربوهیدرات‌های غیر فیبری (NFC، ٪)۲	۲۹/۶
انرژی قابل سوخت و ساز (مگاکالری در هر کیلوگرم ماده خشک)	۲/۷۴
کلسیم (٪)	۰/۸
فسفر (٪)	۰/۴

۱-حاوی ۳ ٪ کلسیم، ۱/۲ ٪ فسفر، ۴ ٪ سدیم، ۱۱۰۰۰ میلی‌گرم منیزیم، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم منگنز، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی، ۳۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آهن، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس، ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ید، ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کبالت،۴۰۰۰۰۰ واحد بین المللی در کیلوگرم ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین المللی در کیلوگرم ویتامین D، ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B۱، ۲۰ میلی‌گرم ویتامین B۲،

۲-(درصد پروتئین خام+درصد خاکستر+درصد چربی خام+درصد الیاف نامحلول در شوینده خنثی) - 100 =2-NFC(%)

قبل شماره‌گذاری شده، انتقال گردید و سپس در آون با دمای ۶۰ درجه به‌مدت ۴۸ ساعت تا خشک شدن نهایی نگهداری شدند. در ادامه میزان گوارش‌پذیری ماده خشک تعیین شد. از طریق خاکستر کردن نمونه‌های باقیمانده، درصد گوارش‌پذیری ماده آلی نمونهٔ خوراکی اضافه شده به محیط کشت نیز تعیین شد.

پس از صاف کردن محتوای شیشه‌ها، مقدار ۵ میلی‌لیتر از نمونهٔ محیط کشت با ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط و تا انجام آزمایشات بعدی در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت پس از یخ‌گشایی، مقدار نیتروژن آمونیاکی به‌روش کجلدال تعیین شد (۳۱). نمونه‌گیری از محیط کشت و آماده‌سازی نمونه‌ها برای اندازه‌گیری کل اسیدهای چرب فرار (TVFA) بر اساس روش گتاچیو و همکاران (۲۴) انجام شد و نیز تعیین غلظت TVFA بر اساس روش برنت و رید (۴) و به‌کمک دستگاه مارخام و در دو مرحلهٔ تقطیر و تیتراسیون انجام شد.

تعیین ضریب تفکیک‌پذیری (PF)، تودهٔ میکروبی تولیدی و بازده تولید تودهٔ میکروبی

برای تعیین فراسنجه‌های این بخش از یک محیط کشت مشابه آزمون گاز استفاده شد. همچنین از روش ماکار (۳۳) برای تعیین ضریب PF استفاده شد به‌طوری‌که این ضریب عبارت بود از میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده واقعی تقسیم بر میلی‌لیتر گاز تولیدی (زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون) که مطابق با معادلهٔ (۱) تعیین شد (۴۹).

معادلهٔ (۱)

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

در معادلهٔ (۱)، c، b و a به‌ترتیب معادل ماده آلی ریخته شده در هر شیشه، مقدار خاکستر مواد هضم نشده در هر شیشه (میلی‌گرم) و مقدار ماده خشک تجزیه نشده در هر شیشه (میلی‌گرم) می‌باشد. پس از اتمام زمان ثبت گاز تولیدی در طی ۲۴ ساعت انکوباسیون، محتویات داخل شیشه‌ها بداخل کیسه‌های پلی‌استری انتقال و با کمک دستگاه انکوم، با محلول شوینده خنثی (NDS)، اقدام به حذف پروتئین میکروبی تولید شده در آن‌ها شد. در انتها کیسه‌ها بداخل آون با دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت انتقال و پس از خشک شدن و توزین (کسر کیسهٔ همراه نمونه هضم‌نشده بعد از استفاده از محلول NDS و خشک شدن در آون از کیسه‌های خالی=a، میلی‌گرم)، بداخل کروزه‌های از پیش وزن شده انتقال و در کوره با دمای ۵۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴ ساعت خاکستر شدند (وزن خاکستر خالص: b، میلی‌گرم). همچنین چند کیسهٔ خالی به‌عنوان عامل تصحیح برای محاسبهٔ میزان خاکستر آنها و به‌عنوان عامل تصحیح در نظر گرفته شد. در نهایت از تفاضل مقدار b از a، مقدار مادهٔ آلی تجزیه نشده بر حسب میلی‌گرم محاسبه شد (۴۲). همچنین میزان تودهٔ میکروبی تولید شده بر اساس معادلهٔ (۲) و به‌روش ماکار (۳۳) محاسبه شد که در این رابطه MM معادل میلی‌گرم تودهٔ میکروبی تولید شده، NG معادل میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون و ۲/۲ ضریب استوکیومتری می‌باشد.

معادلهٔ (۲)

$$MM\ (\text{میلی‌گرم}) = [c - (a - b)] - [NG\ (\text{میلی‌لیتر}) \times 2.2]$$

بازده تولید تودهٔ میکروبی از تقسیم میلی‌گرم تودهٔ میکروبی تولیدی بر میلی‌گرم مادهٔ آلی حقیقی هضم شده و ضرب آن در عدد ۱۰۰، محاسبه شد.

برآوردها و تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) به‌کمک نرم‌افزار SAS (۴۶) آنالیز آماری شدند. اختلاف آماری بین تیمارها در سطح ۵ درصد و با آزمون دانکن تعیین شد. در این طرح از مدل آماری Yij =μ+Ti+eij استفاده شد که در آن Yij = مقدار هر مشاهده، μ= میانگین کل، Ti= اثر تیمار و eij= خطای آزمایشی بود. داده‌های حاصل از آزمون گاز با کمک معادلهٔ $Y=b(1-e^{-ct})$ آنالیز شدند که در آن، Y= حجم گاز تولیدی در زمان t، b= گاز تولید شده از بخش دارای پتانسیل تولید گاز پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، c= ثابت نرخ تولید گاز برای b (درصد در ساعت) و t= زمان انکوباسیون (ساعت) می‌باشد (۴۱).

نتایج

فراسنجه‌های تخمیری

فراسنجه‌های تخمیری حاصل از افزودن عصارهٔ استخراج شده از کلپوره در محیط کشت در جدول ۲ ارائه شده است. با افزایش غلظت عصارهٔ هگزانی کلپوره در محیط کشت، به‌صورت خطی، نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار کل افزایش معنی‌داری یافته به‌طوری‌که بیشترین مقدار این فراسنجه‌ها مربوط به سطح ۴۵۰ قسمت در میلیون عصاره بود. در مقابل، pH محیط کشت با افزودن عصاره تغییری ننمود.

فراسنجه‌های تولید گاز

فراسنجه‌های تولید گاز حاصل از افزودن عصارهٔ استخراج شده از کلپوره در محیط کشت در جدول ۳ ارائه شده است. کلیهٔ فراسنجه‌های تولید گاز (شامل گاز ۲۴ و ۴۸ ساعت، پتانسیل تولید گاز و ثابت نرخ تولید گاز) تحت تأثیر افزودن سطوح مختلف عصارهٔ کلپوره به محیط کشت قرار نگرفتند.

گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی، ضریب PF و تودهٔ میکروبی تولیدی

برخی فراسنجه‌های هضمی و تودهٔ میکروبی در جدول ۴ آورده شده است. گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی تحت تأثیر افزودن عصارهٔ کلپوره به محیط کشت قرار نگرفتند ولی ضریب PF، تودهٔ میکروبی تولیدی و بازده تولید تودهٔ میکروبی در محیط کشت، کاهش معنی‌داری (بصورت خطی) نشان دادند. بیشترین مقدار PF، تودهٔ میکروبی تولیدی

و بازده تولید توده میکروبی در تیمار شاهد مشاهده شد.

بحث

فراسنجه‌های تخمیری

محصول نهایی تخمیر در شکمبهٔ نشخوارکنندگان تولید اسیدهای چرب فرار می‌باشند که بخش اعظم انرژی مورد نیاز این دسته از حیوانات از طریق آن‌ها تأمین می‌گردد. در این مطالعه بیشترین تولید اسیدهای چرب فرار کل (۴۳/۸۷ میلی‌مول/لیتر) مربوط به سطح ۴۵۰ قسمت در میلیون عصارهٔ کلپوره بود که نشان از تأثیرگذاری بیشتر این سطح بر روند تخمیر در محیط کشت دارد. استفاده از دوزهای مختلف عصاره‌های گیاهی به‌ویژه در سطوح بالا (۳۰۰ قسمت در میلیون)، منجر به کاهش معنی‌دار TVFA در محیط کشت شد (۸). مطالعه‌ای که بیان‌کنندهٔ اثر عصارهٔ هگزانی کلپوره بر فعالیت‌های تخمیری میکروارگانیسم‌های شکمبه باشد، تاکنون گزارش نشده است، اما نتایج مطالعه‌ای نشان داد که اسانس گیاه کلپوره دارای اثرات ضد میکروبی برعلیه طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشد (۱۹). در حقیقت عصاره‌های گیاهی، ترکیبی از متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی بوده که از ترکیبات متفاوتی برخوردار هستند، بهمین دلیل تعیین نحوهٔ تأثیرگذاری و پتانسیل عمل آنها بر علیه میکروارگانیسم‌ها یا سلول‌های هدف خاص، اغلب مشکل می‌باشد (۱۵). در مطالعات بسیاری مشخص شده که غلظت TVFA محیط کشت تحت تأثیر دوزهای پایین‌تر اسانس‌های گیاهی قرار نگرفته اما در دوزهای بالاتر آنها، غلظت TVFA کاهش یافته است (۱۴، ۴۲). در واقع غلظت TVFA می‌تواند متأثر از فاکتورهای متعددی همچون نوع و ترکیب سوبسترای انکوبه شده و یا شرایط محیط کشت نیز باشد (۱۵). گزارش شده است که بسیاری از اثراتی که عصاره‌های گیاهان دارویی دارند، مربوط به ترکیب مواد مؤثرهٔ موجود در آنها می‌باشد (۱۳)، از طرفی در تحقیقی

جدول ۲- فراسنجه‌های تخمیری حاصل از افزودن عصارهٔ استخراج شده از کلپوره در محیط کشت

	سطح عصارهٔ کلپورهٔ افزوده شده به محیط کشت (قسمت در میلیون)					سطح معنی‌داری		
فراسنجه‌های تخمیری	صفر (شاهد)	۱۵۰	۳۰۰	۴۵۰	SEM	خطی	درجه دو	درجه سه
pH	۶/۷۳	۶/۷۱	۶/۶۵	۶/۶۷	۰/۰۴	۰/۲۷	۰/۶۶	۰/۶۲
نیتروژن آمونیاکی (mg/dL)	۳۱/۴۸ b	۳۰/۴۵ b	۳۱/۱۰ b	۳۹/۴۸ a	۲/۲۳	۰/۰۳	۰/۰۶	۰/۵۵
اسیدهای چرب فرار کل (mmol/L)	۳۲/۱۲ b	۳۳/۱۷ b	۳۸/۰۰ ab	۴۳/۸۷ a	۳/۰۹	۰/۰۱	۰/۴۷	۰/۸۶

حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول۳- فراسنجه‌های تولید گاز حاصل از افزودن عصارهٔ استخراج شده از کلپوره در محیط کشت

	سطح عصارهٔ کلپورهٔ افزوده شده به محیط کشت (قسمت در میلیون)					سطح معنی‌داری		
فراسنجه‌های تولید گاز	صفر (شاهد)	۱۵۰	۳۰۰	۴۵۰	SEM	خطی	درجه دو	درجه سه
گاز ۲۴ ساعت (ml/۲۰۰mgDM)	۴۷/۳۵	۴۹/۰۵	۴۸/۶۷	۵۱/۱۰	۱/۱۶	۰/۰۶	۰/۷۶	۰/۳۷
گاز ۴۸ ساعت (ml/۲۰۰mgDM)	۵۵/۳۲	۵۷/۱۷	۵۵/۸۷	۵۷/۴۵	۱/۴۰	۰/۴۳	۰/۹۲	۰/۳۵
پتانسیل تولید گاز (ml/۲۰۰mgDM)	۵۷/۱۶	۵۹/۶۸	۵۸/۹۰	۶۱/۴۳	۱/۳۵	۰/۰۷	۰/۱	۰/۲۹
ثابت نرخ تولید گاز (٪/h)	۰/۱۰۱	۰/۱۰۲	۰/۰۹۷	۰/۱۰۴	۰/۰۰۴	۰/۸۶	۰/۴۸	۰/۳۹

حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

گاز ۲۴ و ۴۸ ساعت، شامل تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون می‌باشند. پتانسیل تولید گاز:b؛ ثابت نرخ تولید گاز: c

مشخص شد که اسانس کلپوره، حاوی ترکیب‌های فرار اصلی همچون آلفا کادینول، ۳-بتا هیدروکسی-آلفا مورولن، آلفا پینن و بتاپینن می‌باشد (۲۰، ۲۱) و همچنین در مطالعهٔ دیگری، ترکیباتی همچون لینالول، کاریوفیلن اکسید و بتاکاریوفیلن در اسانس این گیاه شناسایی شد (۴۷) و یا در آنالیز برگ‌های این گیاه مشخص شد که دارای ترکیباتی همچون فلاوونوئیدها، ایریدوئیدها و سیرسیلیول می‌باشد (۲۶).

نتایج مطالعاتی نشان داده شده که در اغلب موارد، باکتری‌های گرم مثبت به‌دلیل فقدان غشای فسفولیپیدی خارجی غیر قابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست، نسبت به ترکیبات اکثر اسانس‌های گیاهان دارویی همچون کلپوره، حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند (۲۰). عصاره‌ها و اسانس‌ها، جزو متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی بوده که مسئول بو، رنگ و طعم آن‌ها بوده و اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانتی آن‌ها در اثر افزودن به جیرهٔ نشخوارکنندگان، مفید می‌باشد و اکثر اسانس‌های گیاهی در زمرهٔ ترکیبات مفید و بی‌خطر دسته‌بندی می‌شوند که می‌توانند شرایط تخمیر را در شکمبه دستخوش تغییرات نمایند (۹، ۱۰). اغلب ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی، دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و اگرچه که مصرف آن‌ها می‌تواند منجر به کاهش غلظت اسیدهای چرب فرار در شکمبه (VFA) گردد ولی در برخی موارد می‌توانند باعث تغییر در شرایط تخمیر شکمبه‌ای، بدون کاهش VFA گردند. در مطالعهٔ فعلی نیز افزودن عصارهٔ کلپوره منجر به بهبود فرآیند تخمیر منجر به افزایش تولید نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار کل شد. باکتری‌های گرم مثبت موجود در شکمبه، مسئول اصلی تخمیر و تولید اسیدهای تخمیری همچون استات، بوتیرات، لاکتات، آمونیاک و فومارات می‌باشند (۹، ۱۰) اگرچه اثر ضد میکروبی عصارهٔ کلپوره بر برخی سویه‌های گرم مثبت تأیید شده است (۱۹) ولی به‌نظر می‌رسد که افزودن عصاره در این پژوهش، تأثیری بر کاهش جمعیت باکتری‌های گرم مثبت و متعاقباً TVFA نداشته است. مطالعات نشان داده شده که اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در اثر استفاده از دوزهای مختلف آن‌ها، متفاوت می‌باشد (۹، ۱۰). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که برخی از ترکیبات اسانس‌های گیاهی همچون تیمول، یک خاصیت ممانعت‌کنندگی قوی برای تولید متان در شرایط آزمایشگاهی داشته و همچنین غلظت اسیدهای چرب فرار استات و پروپیونات نیز در محیط کشت کاهش داشته است (۲۲). در مطالعهٔ دیگری افزودن یک اسانس گیاهی تجاری تهیه شده از گیاهان دارویی مختلف به یک محیط تهیه شده از مایع شکمبه، منجر به افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار شد ولی غلظت نیتروژن آمونیاکی تغییر نکرد (۱۰). نتایج مطالعات دیگری نیز نشان داده که اسانس‌های گیاهی مورد استفاده در محیط کشت منجر به کاهش نسبت استات به پروپیونات می‌گردند (۱۱). تولید آمونیاک در شکمبه در نتیجهٔ فعالیت باکتری‌های پروتئولیتیک و باکتری‌های تولید کننده آمونیاک بالا (Hyper-ammonia producing) می‌باشد (۳۴) به‌طوری‌که باکتری‌های تولید کنندهٔ آمونیاک بالا در شکمبه، با وجود کم بودن جمعیت آن‌ها، فعالیت دآمیناسیون بالایی دارند (۴۴). در مطالعهٔ حاضر با توجه به افزایش نیتروژن آمونیاکی تولید شده در محیط کشت در اثر استفاده از سطح بالای عصارهٔ کلپوره (۴۵۰ قسمت در میلیون)، به‌نظر می‌رسد که کلپوره تأثیر منفی بر باکترهای پروتئولیتیک نگذاشته است و یا منجر به تقویت آنها در محیط کشت شده است. افزایش واکنش‌های تولید متان احتمالاً منجر به کاهش تجمع هیدروژن در محیط تخمیر می‌گردد و بنابراین کاهش گاز هیدروژن سبب افزایش اکسیداسیون مجدد NADH شده و پس از آن منجر به افزایش تولید اسیدهای چرب فرار می‌گردد (۲۹). از طرفی پیشنهاد شده است که عصاره‌های گیاهی می‌توانند غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه‌ای را از طریق مهار فعالیت پروتئولیتیکی، پپتیدولیتیکی و یا مهار دآمیناسیون اسیدهای آمینه، کاهش دهند (۴۲).

فراسنجه‌های تولید گاز

در اثر تخمیر خوراک، دسته ای از میکروارگانیسم‌ها قادر به تولید گاز

جدول ۴- اثر افزودن عصارهٔ هگزانی گیاه کلپوره بر برخی فراسنجه‌های برآورد شده از محیط کشت در شرایط آزمایشگاهی

فراسنجه‌های گوارش‌پذیری و میکروبی	سطح عصارهٔ کلپورهٔ افزوده شده به محیط کشت (قسمت در میلیون)					سطح معنی‌داری		
	صفر (شاهد)	۱۵۰	۳۰۰	۴۵۰	SEM	خطی	درجه دو	درجه سه
گوارش‌پذیری ماده خشک (٪)	۷۷/۳۹	۷۸/۷۱	۷۸/۶۹	۷۹/۷۰	۰/۹۵	۰/۱۳	۰/۸۷	۰/۵۸
گوارش‌پذیری ماده آلی (٪)	۸۰/۹۷	۷۹/۸۹	۸۲/۱۳	۸۱/۹۲	۰/۸۴	۰/۲۰	۰/۶۲	۰/۱۵
ضریب PF (میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده/میلی‌لیتر گاز تولیدی)	۳/۱۰^{a}	۲/۹۳^{ab}	۲/۹۹^{ab}	۲/۸۰^{b}	۰/۰۶	۰/۰۰۹	۰/۸۹	۰/۱۲
تودهٔ میکروبی تولیدی (میلی‌گرم)	۵۳/۲۷^{a}	۴۵/۹۵^{ab}	۴۸/۰۲^{ab}	۳۹/۴۶^{b}	۲/۷۱	۰/۰۰۷	۰/۸۲	۰/۱۲
بازده تولید تودهٔ میکروبی (٪)	۲۸/۹۸^{a}	۲۵/۰۲^{ab}	۲۶/۱۰^{ab}	۲۱/۴۵^{b}	۲/۱۴	۰/۰۰۶	۰/۸۱	۰/۱۳

حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد ($p<0/05$).

PF: Partitioning Factor، ضریب تفکیک‌پذیری؛ بازده تولید تودهٔ میکروبی از تقسیم میلی‌گرم تودهٔ میکروبی تولیدی بر میلی‌گرم مادهٔ آلی حقیقی هضم شده و ضرب آن در عدد ۱۰۰، محاسبه شد.

در محیط شکمبه خواهند بود که متان یکی از اجزا این گازها می‌باشد و می‌تواند پس از رهاسازی، باعث آلودگی محیط زیست گردد. در این مطالعه، تغییرات معنی‌داری برای فراسنجه‌های تولید گاز در بین سطوح مختلف عصارهٔ هگزانی مشاهده نشد. از آنجایی‌که محیط شکمبه دارای طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد، گزارش شده است که اسانس‌های دارای ترکیبات با ساختار فنولی، دارای طیف گسترده‌ای از اثرات مثبت یا منفی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشند (۳۲). چندین تکنیک متفاوت برای ارزیابی برخی مواد خوراکی و یا افزودنی‌ها ارائه شده است که در بین آن‌ها تکنیک تولید گاز در عین سریع الاجرا بودنش، اجرای آن نسبت به آزمایشات حیوان زنده (in vivo)، ارزان‌تر تمام می‌شود. تکنیک تولید گاز در ابتدا از روی هضم کربوهیدرات‌های محلول و نامحلول اندازه‌گیری شده و مقدار گاز تولید شده در محیط کشت، نشان دهندهٔ تولید اسیدهای چرب فراری خواهد بود که یک منبع اصلی انرژی برای نشخوارکنندگان محسوب می‌شوند و گاز تولیدی در محیط کشت، مستقیماً نشأت گرفته از تجزیهٔ میکروبی خوراک توسط میکروارگانیسم‌ها بوده و بطور غیر مستقیم نیز از بافری بودن اسیدهای تولید شده در نتیجهٔ تخمیر، حاصل می‌شود (۲۴).

در این مطالعه تمایل خطی برای افزایش پتانسیل تولید گاز و نیز تولید گاز در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون وجود داشت و به‌نظر می‌رسد که رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت در حضور عصارهٔ کلپوره طوری بوده که توانسته‌اند سوبسترای بیشتری را به‌سمت تولید گاز بیشتر هدایت نمایند. گزارش شده که اسانس برخی از گیاهان دارویی به‌دلیل توانایی‌شان در تغییر نفوذپذیری سلول‌های میکروارگانیسم‌ها، دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشند (۱۷، ۲۶) و کاربرد آن‌ها در مقادیر پایین، از طریق ایجاد سمیت برای برخی از سویه‌های باکتری‌های تولیدکنندهٔ متان در شکمبه، باعث تغییر الگوی تخمیر شده (۵۰) و در نهایت این شرایط متعاقباً بر میزان تولید گاز نیز تأثیرگذار خواهد بود. یکی از گازهایی که در محیط شکمبه دام‌های نشخوارکننده تولید می‌شود، متان بوده که رهاسازی آن از طریق آروغ به محیط، خسارت جبران‌ناپذیری بر لایهٔ اوزون خواهد داشت و تخمین زده شده است که این گاز ۲۳ برابر بیشتر از دی‌اکسیدکربن منجر به گرم شدن کرهٔ زمین می‌گردد (۲۷)، بنابراین کنترل این گاز از طریق اعمال عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی، از جمله راهکارهای ارزان‌قیمت و با اهمیت در حذف و یا کمتر تولید شدن این گاز گلخانه‌ای می‌باشد. در مطالعهٔ فعلی اگر چه که تولید گاز متان اندازه‌گیری نشد ولی با توجه به اندازه‌گیری حجم کل گاز تولید شده در محیط کشت، مشخص گردید که عصارهٔ هگزانی کلپوره تأثیر معنی‌داری بر کاهش حجم گاز کل که متان یکی از ترکیبات آن می‌باشد، نداشته است، هر چند که ترکیب گازهای ناشی از تخمیر می‌توانند متفاوت باشند. بر اساس مطالعات مختلف، مواد افزودنی خوراکی می‌توانند از طریق مهار پروتوزوآ، تحریک تولید پروپیونات، کاهش تولید هیدروژن و مهار مستقیم باکتری‌های تولید کنندهٔ متان، منجر به کاهش تولید متان گردند (۱۲).

گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی، ضریب *PF* و تودهٔ میکروبی تولیدی

از روش اندازه‌گیری گوارش‌پذیری ماده خشک در آزمایشگاه، به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی کیفیت مواد خوراکی و یا افزودنی در نتیجهٔ همبستگی بالای آن با قابلیت هضم بر روی حیوان زنده استفاده شده است (۲۴، ۳۰) اگر چه که گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در این پژوهش اندازه‌گیری شد، ولی این فراسنجه‌ها تحت تأثیر افزودن عصارهٔ کلپوره به محیط کشت قرار نگرفتند. هر چند که در پژوهشی در اثر استفاده از گیاه گلپر (دارای فلاوونوئید)، ضریب تفکیک‌پذیری (PF)، تولید تودهٔ میکروبی و بازده تولید تودهٔ میکروبی افزایش یافت (۳۸)، اما در مطالعهٔ (همسو با گزارش ما) دیگری، افزودن عصارهٔ آویشن به محیط کشت منجر به کاهش PF شد (۴۵). در حقیقت پایین بودن مقدار PF، بیان کنندهٔ پایین بودن بازده تولید پروتئین میکروبی در محیط کشت بوده و بدین معناست که سهم بیشتری از مادهٔ خوراکی هضم شده صرف تولید گاز نسبت به تولید پروتئین میکروبی شده است (۴۵). همچنین گزارش شده است که افزایش ضریب PF، نشان‌دهندهٔ بهبود بازده تخمیر می‌باشد (۶). در مطالعهٔ حاضر کمترین مقدار PF مربوط به استفاده از سطح ۴۵۰ قسمت در میلیون عصارهٔ کلپوره بود و تولید تودهٔ میکروبی و بازده تولید تودهٔ میکروبی در کمترین مقدار خود قرار داشت که نشان از تأثیرگذار بودن عصارهٔ هگزانی کلپوره بر محیط کشت دارد. همچنین افزایش PF ممکن است بدلیل آزادسازی همزمان انرژی و پروتئین در شکمبه بدلیل تأثیرگذاری برخی از متابولیت‌های ثانویهٔ موجود در گیاهان دارویی باشد (۲۸). محصولات نهایی تخمیر شکمبه‌ای عمدتاً شامل اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، گازهای تخمیری و سلول‌های میکروبی می‌باشند. در صورتی‌که سوبسترای بیشتری توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه تجزیه گردد، انرژی بیشتری در قالب تولید اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر برای دام میزبان فراهم خواهد شد که این انرژی می‌تواند در سنتز سلول‌های میکروبی مورد استفاده قرار بگیرد (۳). بخاطر وجود رابطهٔ معکوس بین گاز تولید شده و تودهٔ میکروبی تولیدی، ضریب تفکیک‌پذیری منعکس‌کنندهٔ تغییرات در تولید تودهٔ میکروبی خواهد بود (۶). در مطالعهٔ حاضر، اگرچه که افزودن عصارهٔ کلپوره تأثیری بر فراسنجه‌های تولید گاز نداشت ولی در مقابل ضریب تفکیک‌پذیری بویژه در سطوح بالای عصاره (۴۵۰ قسمت در میلیون) نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. در واقع انتخاب جیره بر اساس ضریب PF یعنی انتخاب قابلیت گوارش‌پذیری بیشتر به ازای گاز تولیدی کمتر می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که افزایش در تولید TVFA و کاهش تولید تودهٔ میکروبی در مطالعهٔ حاضر (بویژه در سطح ۴۵۰ قسمت در میلیون)، بیشتر مربوط به هدایت ماده آلی تخمیر شده در راستای تولید TVFA بیشتر باشد نه تولید تودهٔ میکروبی، هرچند که این مکانیسم در این مطالعه مبهم می‌باشد. بعبارتی افزایش در تولید TVFA در این مطالعه، بسمت تولید تودهٔ میکروبی بیشتر در محیط کشت هدایت نشده است که شاید بخاطر اثرات مهارکنندگی این عصاره بر طیف خاصی از میکروارگانیسم‌ها و یا تغییر در برهمکنش بین آنها باشد. همچنین گزارش شده است که کاهش در غلظت نیتروژن آمونیاکی، افزایش تولید تودهٔ میکروبی را بدنبال داشته و این کاهش در غلظت

نیتروژن آمونیاکی نیز می‌تواند ناشی از کاهش تجزیهٔ پروتئین موجود در سوبسترای اضافه شده به محیط کشت نیز باشد (۱). به احتمال زیاد بخشی از کاهش تولید تودهٔ میکروبی در مطالعهٔ ما می‌تواند مربوط به افزایش تولید نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت (بویژه در سطح ۴۵۰ قسمت در میلیون عصاره) نیز باشد. از طرفی غلظت نیتروژن آمونیاکی خود به‌تنهایی نمی‌تواند برای ارزیابی تجزیه‌پذیری پروتئین خام جیره و یا تولید تودهٔ میکروبی استفاده شود بلکه تجزیهٔ پروتئین خام و تولید پروتئین میکروبی در شکمبه، هر دو بصورت همزمان رخ می‌دهد (۱). در قسمت‌های هوایی گیاه کلپوره، دو ترکیب عمده از قبیل ورباسکوزید و پولیموزید شناسایی شده است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و یا ضدمیکروبی می‌باشند (۵).

نتیجه‌گیری

به‌نظر می‌رسد که عصارهٔ هگزانی بکار رفته در مطالعهٔ حاضر، پتانسیل لازم را در اثرگذاری بر تخمیر شکمبه‌ای در جهت افزایش تولید مهمترین منبع انرژی یعنی TVFA در سطوح بالاتر آن (۴۵۰ قسمت در میلیون) دارد. همچنین تولید نیتروژن آمونیاکی در این سطح از عصاره در بالاترین مقدار خود قرار داشت. بسیاری از فراسنجه‌های تخمیری تا سطوح ۳۰۰ قسمت در میلیون در مقایسه با تیمار شاهد تغییر معنی‌داری ننمود و نیز به‌نظر می‌رسد که عصارهٔ هگزانی کلپوره، در سطوح ۴۵۰ قسمت در میلیون و یا بالاتر از آن، می‌تواند شرایط تخمیر را دستخوش تخمیر نماید. همچنین استفاده از این عصاره در سطوح بالا (۴۵۰ قسمت در میلیون)، تأثیر منفی بر تولید تودهٔ میکروبی و بازده تولید تودهٔ میکروبی در محیط کشت گذاشت. با توجه به اطلاعات موجود، پیشنهاد می‌گردد که تحقیقات بیشتری برای بررسی اثرات سطوح مختلف عصارهٔ کلپوره بر روی حیوان زنده نیز انجام شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی مصوب معاونت آموزشی-پژوهشی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام انجام گرفت و نویسندگان مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از این مجتمع و معاونت مربوطه اعلام می‌دارند.

منابع مورد استفاده

1. Alexander, G., B. Singh, A. Sahoo and T. K. Bhat. 2008. *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. *Animal Feed Science and Technology* 145: 229-244.

2. AOAC. 1999. Official Methods of Analysis. 16th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.

3. Baba, A. S. H., F. B. Castro and E. R. Ørskov. 2002. Partitioning of energy and degradability of browse plants *in vitro* and the implications of blocking the effects of tannin by the addition of polyethylene glycol. *Animal Feed Science and Technology* 95: 93-104.

4. Barnett, A. J. G. and R. Reid. 1957. Studies on the production of volatile fatty acids from grass in artificial rumen. 1. Volatile fatty acids production from fresh grasses. *Journal of Agricultural Science* (*Cambridge*) 48: 315-321.

5. Bedir, E., D. Tasdemi, I. Çalis, O. Zerbe and O. Sticher. 1999. Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium*. *Phytochemistry* 51: 921-925.

6. Blummel, M., H. Steingass and K. Becker. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition* 77: 911-921.

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

8. Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret and C. Kamel. 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.

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

10. Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret and R. Losa. 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet of rumen microbial fermentation and nutrient flow from continuous culture systems. *Animal Feed Science and Technology* 119: 29-41.

11. Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret and R. Losa. 2007. Effects of dose and adaptation time of a specific blendof essential oil compound on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 132: 186-201.

12. Castro-Montoyaa, J., S. De Campeneere, G. Van Ranst and V. Fievez. 2012. Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on *in vitro* methane and VFA production. *Animal Feed Science and Technology* 176: 47-60.

13. Chua, L. Y. W., C. H. Chong, B. L. Chua and A. Figiel. 2019. Influence of drying methods on the antibacterial, antioxidant and essential oil volatile composition of herbs: a Review. *Food and Bioprocess Technology* 12 (3): 450-476.

14. Cobellis, G., A. Petrozzi, C. Forte, G. Acuti, M. Orru, M. C. Marcotullio, A. Aquino, A. Nicolini, V. Mazza and M. Trabalza-Marinucci. 2015. Evaluation of the effects of mitigation on methane and ammonia production by using *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils on *in vitro* rumenfermentation systems. *Sustainability* 7: 12856-12869.

15. Cobellis, G., M. Trabalza-Marinucci and Z. Yu. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: a review. *Science of the Total Environment* 545: 556-568.
16. Cobellis, G., M. Trabalza-Marinuccia, M. C. Marcotullioc and Z. Yu. 2016. Evaluation of different essential oils in modulating methaneand ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 215: 25-36.
17. Conner, D. E. 1993. Naturally occurring compounds. In: Davidson, P.M., Branen, A.L. (Eds.), Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker, New York, NY, USA. pp: 441-468.
18. Eckard, R. G., C. Grainger and C'. A. M. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science* 130 (1-3): 47-56.
19. El-Shazly, A. M. and K. T. Hussein. 2004. Chemical analysis and biological activities of the essential oil of *Teucrium leucocladum* Boiss. (Lamiaceae). *Biochemical Systematic and Ecology* 32 (7): 665-674.
20. Esmaeili, A. and H. Amiri. 2008. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Teucrium Polium* L. *Research Journal of University of Isfahan* (*Science*) 31 (2): 15-22.
21. Esmaeili, M. A. and R. Yazdanparast. 2004. Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *Journal of Ethnopharmacology* 95(1): 27-30.
22. Evans, J. D. and S. A. Martin. 2000. Effects of Thymol on ruminal microorganisms. *Current Microbiology* 41(5): 336-340.
23. Galati, E. M., M. R. Mondello, A. D'Aquino, N. Miceli, R. Sanogo, O. Tzakou and M. T. Monforte. 2000. Effects of *Teucrium divaricatum* Heldr. SSp. divaricatum decoction on experimental ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 72: 337-342.
24. Getachew, G., P. H. Robinson, E. J. DePeters and S. J. Taylor. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 111 (1-4): 57-71.
25. Hassan, M., F. Muhtadi and A. Al-Badr. 1979. GLC-mass spectrometry of *Teucrium polium* oil. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 68 (6): 800-1.
26. Helander, I. M., H. L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris and A.Von Wright. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3590-3595.
27. IPCC. 1996. Guidelines for national greenhouse gas inventories—Greenhouse Gas Inventory Reference Manual. IPCC WGI Technical Support Unit, Bracknell, UK.
28. JimEnez-Peralta, F. S., A. Z. M. Salem, P. Mejia-Hernndez, M. Gonzlez-Ronquillo, B. lbarrn-Portillo, R. Rojo-Rubio and J. L. Tinoco-Jaramillo. 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *Livestock Science* 136: 192-200.
29. Joblin, K. N. 1999. Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 1307-1313.
30. Kazemi, M., A. M. Tahmasbi, R. Valizadeh, A. A. Naserian and M. M. Moheghi. 2009. Assessment of nutritive value of four dominant weed species in range of Khorasan distinct of Iran by *in vitro* and in situ techniques. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8 (11): 2286-2290.
31. Komolong, M. K., D. G. Barber and D. M. McNeill. 2001. Post-ruminal protein supply and N retention of weaner sheep fed on a basal diet of lucerne hay (*Medicago sativa*) with increasing levels of quebracho tannins. *Animal Feed Science and Technology* 92(1-2): 59-72.
32. Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, P. Coote and G. J. E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied. Microbiology* 91: 453-462.
33. Makkar, H. P. S. 2010. *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis (pp. 106-144). In: *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Nuclear and Related Methodologies (Ed.), New York. Springer.
34. McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever and C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environmental Microbiology* 69(8): 5011-5014.
35. Menke, K. H. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development* 28: 7-55.
36. Mosaddegh, M., A. Dehmoobed Sharifabad, P. Nasirin, S. Esmaeili and F. Naghibi. 2002. The study of phytochemical, antifungal and antibacterial effects of *Teucrium polium* and *Cichourium intybus*. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 25 (7): 1-6.
37. Niazmand, S., H. Neamati Karimui and M. Sparhem. 2010. The Effects of aqueous-ethanol extract of *Teucrium polium* L. on rabbit's blood pressure, heart rate and intraventricular pressure. *Journal of Medicinal Plants* 1 (33): 90-97.
38.Nooriyan Soroor, E. and Y. Rouzbehan. 2014. The influence of Golpar (*Heracleum persicum*) on *in vitro* rumen fermentation parameter, sand on methane production. *Iranian Journal of Animal*

Science 44 (4): 385-395.

39. NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th Edition. National Academy Press, Washington, D.C., USA 381p.

40. NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids. 6th Edition. Washington: National Academy Press, Washington, D.C., USA, 384p.

41. Ørskov, E. R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92: 499-503.

42. Patra, A. K. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6: 416-428.

43. Rizk, A. M., F. M. Hammouda, H. Rimpler and A. Kamel. 1986. Iridoids and flavonoids of *Teucrium polium* Herb. *Planta Medica* 2: 87-88.

44. Russell, J. B., H. J. Strobel and G. Chen. 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 872-877.

45.Sallam, S. M. A., I. C. S. Bueno, P. Brigide, P. B. Godoy, D. M. S. S.Vittii and A. L. Abdalla. 2009. Efficiency of eucalyptus oil on *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *Nutritional and Foraging Ecology of Sheep and Goats* 85: 267-272.

46.SAS Institute INC. 2002. Sas user's Guide: statistics. Statistical Analysis Systems Institute Inc. Cary NC.

47.Sharififar, F., G. Dehghn-Nudeh and M. Mirtajaldini. 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry* 112(4): 885-885.

48. Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48, 185-197.

49. Vercoe, E. P., H. P. S. Makkar and A. C. Schlink. 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.

50. Wallace, R. J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society* 63: 621-629.

51.Yazdanparast, R., M. A. Esmaeili and J. Ashrafi. 2005. *Teucrium polium* extract effects pancreatic function of streptozotocin diabetic rats: A histopathological examination. *Iranian Biomedical Journal* 9(2): 81-5.

52.Zargari, A. 1997. Medicinal Plants. Tehran University Press, Iran, pp: 103-104.