مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۰ شماره ۱/ سال۱۳۹۹/ صفحات ۲۹ تا ۴۳

DOI: 10.22034/AS.2020.11001

مطالعه‌ی آزمایشگاهی تأثیر اسانس روغنی بالنگو (*Lallemantia royleana*) برکینتیک تولید گاز، تجزیه‌پذیری، جمعیت پروتوزوآ و برخی پارامترهای تخمیری یک جیره‌ی بالانس شده

محسن کاظمی[1*]

تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۸/۱۸

[1] استادیار گروه علوم دامی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام

*مسئول مکاتبه:Email: phd1388@gmail.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: امروزه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره‌های نشخوارکنندگان به‌عنوان محرک‌های رشد به‌دلیل ایجاد مقاومت چندگانه‌ی باکتریایی که می‌تواند سلامت انسان‌ها را به‌خطر بیندازند، محدود شده‌اند. اخیراً تلاش‌ها برای استفاده از جایگزین‌کننده‌های سالم بجای آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته است. از طرفی شناسایی ترکیباتی که منجر به تغییر الگوی تخمیر شکمبه‌ای در جهت بهبود راندمان مصرف خوراک گردد، نیز حائز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش اثر استفاده از سطوح مختلف اسانس روغنی بالنگو بر برخی پارامترهای تخمیری-میکروبی، تجزیه‌پذیری ماده خشک (IVDMD) و ماده آلی (IVOMD)، فراسنجه‌های تولید گاز، جمعیت پروتوزوآ و تولید متانِ یک جیره در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. **روش کار**: اسانس روغنی بالنگو پس از برداشت در مرحله‌ی گلدهی، با استفاده از کلونجر استخراج شد. از یک محیط کشت ثابت جهت بررسی اثرات سطوح مختلف این اسانس (صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم/لیتر) استفاده شد. تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون و نیز IVDMD و IVOMD بر اساس روش‌های استاندارد تعیین شدند. همچنین برخی فراسنجه‌های تخمیری-میکروبی [شامل pH، نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار کل (TVFA)، توده‌ی میکروبی تولیدی (MMY)، ضریب تفکیک‌پذیری (PF) و بازده سنتز توده‌ی میکروبی (EMMS)]، تولید متان و جمعیت کل پروتوزوآ در محیط کشت تعیین شدند. **نتایج**: تغییری در غلظت نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوآ در اثر افزودن اسانس مشاهده نشد ولی pH به‌طور معنی‌داری (خطی، P=۰/۰۲) نسبت به تیمار شاهد کاهش و TVFA افزایش نشان داد. با افزایش سطح اسانس، اغلب فراسنجه‌های تولید گاز (پتانسیل تولید گاز و نیز گاز تولید شده در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون) به‌صورت خطی و درجه دو افزایش معنی‌دار نشان دادند، هرچند که متان تولیدی تغییر ننمود. اگرچه که IVDMD و IVOMD در اثر افزودن اسانس افزایش معنی‌داری (خطی و درجه دو) نشان دادند، ولی در مقابل PF، MMY و EMMS کاهش معنی‌داری (خطی و درجه دو) در برابر شاهد نشان دادند. **نتیجه‌گیری نهایی**: نتایج کلی نشان داد که اسانس بالنگو می‌تواند الگوی تخمیر را در جهت بهبود برخی فراسنجه‌ها (تولید گاز و TVFA بیشتر و افزایش تجزیه‌پذیری)، دستخوش تغییراتی نماید و به‌نظر می‌رسد که سطح ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره، بیشترین تأثیر را بر این فراسنجه‌ها گذاشته است.

واژگان کلیدی: افزودنی خوراکی، کشت ثابت آزمایشگاهی، الگوی تخمیر، گیاه دارویی

مقدمه

شناسایی موادی که باعث تعدیل تخمیر شکمبه‌ای با هدف افزایش بازدهی مصرف خوراک گردد، در برنامه‌ی تغذیه‌ای نشخوارکنندگان، روز به روز در حال افزایش می‌باشد. یکی از مهمترین این مواد یونوفرها بوده که به‌طور گسترده‌ای از آن‌ها به‌عنوان محرک رشد استفاده می‌شود اما اخیراً به‌دلیل ریسک ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها در افراد مصرف‌کننده، استفاده از آن‌ها در اغلب نقاط دنیا به‌ویژه اتحادیه‌ی اروپا ممنوع شده است (مک گوفی و همکاران ۲۰۰۹ و هیئت بین دولتی تغییر اقلیم ۲۰۰۷). این موارد باعث گشته تا تولیدکنندگانِ فرآورده‌های دامی به‌سمت استفاده از مواد کم‌خطرتری همچون عصاره‌های گیاهی که بهبوددهنده‌های تخمیر شکمبه‌ای طبیعی محسوب می‌گردند، روی بیاورند. مطالعات بسیاری بر روی استفاده از اسانس گیاهان مختلف دارویی در جهت دستکاری و بهبود تخمیر شکمبه‌ای انجام شده است (پیوستگان و همکاران ۲۰۱۳، رستم‌زاده و همکاران ۲۰۱۴ و صحرایی بلوردی و پیرمحمدی ۲۰۱۵). گزارش شده است که اغلب این عصاره‌ها دارای خاصیت ضدمیکروبی ویژه‌ای به‌دلیل تغییر در نفوذپذیری دیواره‌ی سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (کونر ۱۹۹۳ و هلاندر و همکاران ۱۹۹۸). مصرف این عصاره‌ها به‌عنوان بهبوددهنده‌های تخمیر شکمبه‌ای در دوزهای پایین به‌دلیل دارا بودن اثر سمیتی بر برخی از سویه‌های باکتریایی همچون متانوژنزها، پیشنهاد شده است (والاس ۲۰۰۴). اثرات مثبت استفاده از اسانس‌های روغنی مختلف به‌صورت انفرادی یا ترکیب با یکدیگر بر تخمیر شکمبه‌ای (عمدتاً در جهت کاهش نسبت استات به پروپیونات) در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (کاردوزو و همکاران ۲۰۰۵ و کاستیلجوس و همکاران ۲۰۰۷). بنابراین استفاده از سطوح مناسب اسانس در جهت کنترل شرایط تخمیر و جلوگیری از اثرات منفی آن‌ها، ضروری می‌باشد.

بالنگو (*Lallemantia royleana*) گیاهی از خانواده‌ی نعناعیان بوده که در نواحی مختلف ایران پراکنش دارد و این گیاه به‌ویژه دانه‌های آن در چند دهه‌ی اخیر، مصارف دارویی فراوانی در طب سنتی ایران داشته است (زرگری ۱۹۹۶)، به‌طوری‌که از دانه‌های آن برای درمان بیماری‌های دستگاه گوارش، بیماری‌های تنفسی و نیز درمان اختلالات ادراری و کلیوی استفاده می‌گردد (بزرگی و وزیران ۲۰۱۶). میزان چربی خام، پروتئین خام و خاکستر خام موجود در دانه‌های این گیاه به‌ترتیب معادل ۱۸/۲۷، ۲۵/۶ و ۱/۲۹ درصد گزارش شده است (رضوی و همکاران ۲۰۰۸) و عمده‌ترین اسیدهای چرب موجود در روغن دانه‌ی این گیاه، شامل اسید لینولئیک، اولئیک، پالمیتیک و استئاریک بوده و نیز بتاسیتوسترول می‌باشند (خاری ۲۰۰۷). همچنین کربوهیدرات‌هایی همچون رامنوز، آرابینوز، گالاکتوز، گلوکز و زایلوز در موسیلاژ دانه‌ی این گیاه شناسایی شده است (رضوی و همکاران ۲۰۱۶). دو ترکیب شیمیایی عمده شامل ترانس-پینوکارویل استات (۲۶ درصد) و پینوکاروون (۲۰ درصد) در اسانس روغنی حاصل از بخش‌های هوایی بالنگو شناسایی شده است (شریفی راد و همکاران ۲۰۱۵).

از آنجایی‌که تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر اسانس این گیاه بر فعالیت‌های تخمیری میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای صورت نگرفته است، بنابراین این آزمایش با هدف مطالعه‌ی آزمایشگاهی تأثیر اسانس روغنی بالنگو (*Lallemantia royleana*) بر کینتیک تولید گاز، تجزیه‌پذیری، جمعیت پروتوزوآ و برخی پارامترهای تخمیری یک جیره‌ی بالانس شده برای بره پرواری انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی گیاه و روش اسانس‌گیری

نمونه‌ی کاملی از گیاه بالنگو (*Lallemantia royleana*) در زمان گلدهی و در فصل بهار از مناطق کوهستانی روستای رونج شهرستان تربت‌جام جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه مرکزی انتقال داده شد. اسانس نمونه‌های خشک شده در سایه از گیاه کامل بالنگو (شامل ساقه، برگ و گل) پس از آسیاب با مش ۲ میلیمتری، با کمک دستگاه کلونجر و به‌روش تقطیر با آب تهیه شد (داروشناسی بریتانیا ۱۹۸۸) و در تیوپ‌های مخصوص

ریخته و تا انجام مراحل بعدی آزمایش در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

Table 1- Chemical composition and dietary ingredients incubated in the culture medium

Ingredients	Amount (%)
Alfalfa, milled	11.21
Corn silage	11.21
Barley straw, milled	7.68
Barley grain, milled	19.97
Corn grain, milled	19.97
Wheat bran	4.61
Sugar beet pulp	6.14
Soybean meal	6.14
Cotton seed meal	6.14
Salt	1.54
Sodium bicarbonate	1.54
Magnesium oxide	1.54
Vitamin-mineral supplement	1.54
Calcium carbonate	0.77
Chemical compositions	
Crude protein (%)	15.2
Ash (%)	12.4
Crude fat (%)	2.7
NDF (%)	32.1
NFC (%)	39.8
ME (Mcal/kg DM)	2.34
Calcium (%)	0.72
Phosphorus (%)	0.36

1-Containing 100 mg vit. E, 10 mg vit. B1, 20 mg vit B2, 400000 IU vit. A, 100000 IU vit. D, 3% Calcium, 1.2% Phosphorus, 4% Na, 1000 mg Cu, 60 mg I, 60 mg Co, 11000 mg Mg, 2000 mg Manganese, 3000 mg Fe.

تهیه‌ی جیره و محیط کشت و روش‌های اندازه‌گیری

جیره‌ی مورد نظر (جدول ۱) برای انکوباسیون در محیط کشت، بر اساس احتیاجات تغذیه‌ای بره‌ی پرواری شش ماهه‌ی بلوچی با وزن تقریبی معادل ۳۸ کیلوگرم تهیه شد (مؤسسه تحقیقات ملی ۲۰۰۷). نسبت علوفه به کنسانتره ۳۰ به ۷۰ در نظر گرفته شد. محلول‌های مورد نیاز برای آزمون تولید گاز و تجزیه‌پذیری ماده خشک (IVDMD) و ماده آلی (IVOMD) بر اساس روش منک و استینگاس (۱۹۸۸) تهیه شد. همچنین اندازه‌گیری فشار و حجم تولید گاز بر اساس روش تئودورو و همکاران (۱۹۹۴) انجام شد. مایع شکمبه از دو رأس گوسفند نر بلوچی (۳/۵±۳۰ کیلوگرم) دارای فیستولای شکمبه‌ای که با یک جیره‌ی غذایی در حد نگهداری (شامل کاه جو و یک کنسانتره تجاری با انرژی معادل ۱۰/۱۵ مگاژول/کیلوگرم ماده خشک) تغذیه می‌شدند، جمع‌آوری شد. میزان ۲۰۰ میلی‌گرم از جیره (جدول ۱) به‌داخل شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس اسانس بالنگو در چهار سطح (صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم/لیتر) به آن اضافه (برای هر سطح ۴ تکرار در نظر گرفته شد) و در ادامه مقدار ۳۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی همراه با مایع شکمبه (با نسبت ۲ به ۱) به‌داخل شیشه‌ها ریخته شد. بلافاصله درب آن‌ها پلمپ شده و به حمام آب گرم با حرارت ۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

میزان تولید گاز در زمان‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون با کمک فشارسنج دیجیتالی ثبت و همزمان حجم گاز با کمک سرنگ مدرج ثبت شد. پس از اتمام زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون، درب شیشه‌ها باز و بلافاصله محتوای هضم نشده‌ی هر شیشه با پارچه پلی‌استری (قطر ۴۵ میکرون) صاف و به‌داخل کروزه‌های از قبل توزین شده انتقال و پس از خشک شدن کامل نمونه، درصد تجزیه‌پذیری ماده خشک محاسبه و در ادامه پس از خاکستر کردن نمونه‌های داخل کروزه در دمای ۵۵۰ درجه به‌مدت ۴ ساعت، درصد تجزیه‌پذیری ماده آلی نیز محاسبه شدند. همچنین pH محتوای شیشه‌ها بلافاصله بعد از صاف شدن، اندازه‌گیری شد و ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ی صاف شده همراه با ۵ میلی‌لیتر

اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط و تا زمانِ اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی به‌روش کجلدال (کومولونگ و همکاران ۲۰۰۱) در فریزر ۱۸- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌گیری از محیط کشت و ذخیره سازی آن‌ها برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار کل (TVFA) بر اساس روش گتاچیو و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد و در نهایت تعیین مقدار TVFA به‌کمک دستگاه مارخام انجام شد (برنت و رید ۱۹۵۷). تعداد ۴ شیشه‌ی مجزا برای هر سطح اسانس در نظر گرفته شد و پس از ثبت حجم گاز تولیدی در انتهای زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون، برای اندازه‌گیری مقدار متان تولید شده، ۴ میلی‌لیتر سود ۱۰ مولار به محتوای هر یک از شیشه‌ها اضافه گردید. در حقیقت با تزریق NaOH، گاز دی اکسید کربن توسط آن جذب شده و در نهایت حجم گاز باقی‌مانده در هر شیشه به‌عنوان حجم گاز متان اندازه‌گیری شد (فیوز و همکاران ۲۰۰۵).

از محیط کشت مشابهِ آزمون تولید گاز (منک و استینگاس ۱۹۸۸) برای تعیین فراسنجه‌های میکروبی استفاده شد. همچنین از روش ماکار (۲۰۱۰) برای تعیین ضریب تفکیک‌پذیری (PF) استفاده شد به‌طوری‌که این ضریب از تقسیم میلی‌گرم ماده‌ی آلی تجزیه شده‌ی حقیقی بر میلی‌لیتر گاز تولیدی (معادله‌ی ۱) محاسبه شد (ورکو و همکاران ۲۰۱۰). ضریب تفکیک‌پذیری برای زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون محاسبه شد. معادله‌ی (۱):

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

در معادله‌ی (۱)، c، b و a به‌ترتیب برابر با ماده‌ی آلی خام ریخته شده در هر شیشه، مقدار خاکستر مواد هضم نشده‌ی حقیقی در هر شیشه (میلی‌گرم) و مقدار ماده خشک تجزیه نشده‌ی حقیقی در هر شیشه (میلی‌گرم) می‌باشد (البته مواد هضم نشده بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون، پس از جمع‌آوری از شیشه‌ها با هدف شستن و زدودن بقایای میکروبی با محلول شوینده‌ی خنثی شسته شدند). همچنین IVGP نیز معادل گاز تجمعی تولید شده در ۹۶ ساعت انکوباسیون بود. پس از اتمام زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون، درب شیشه‌ها باز و محتویات آن‌ها به‌داخل کیسه‌های پلی‌استری انتقال و با کمک دستگاه حرارتی پلمپ و با استفاده از دستگاه انکوم و محلول شوینده‌ی خنثی (NDS)، شستشو داده شدند. پس از اتمام زمان شستشو با محلول، کیسه‌ها به‌داخل آون با دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت انتقال و پس از خشک شدن و توزین (تفاضل کیسه‌ی همراه مواد هضم نشده بعد از استفاده از محلول NDS و خشک شدن در آون، از کیسه‌ی خالی=a، mg)، به‌داخل کروزه‌های از پیش وزن شده انتقال و در کوره با دمای ۵۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴ ساعت خاکستر شدند (وزن خاکستر خالص: b، میلی‌گرم). همچنین چند کیسه‌ی خالی به‌عنوان عامل تصحیح برای تولید خاکستر موجود در آن‌ها در نظر گرفته شد و از خاکستر نمونه‌ی هضم نشده‌ی حقیقی کسر گردید. در نهایت از تفاضل مقدار b از a، مقدار ماده‌ی آلی تجزیه نشده‌ی حقیقی بر حسب میلی‌گرم محاسبه شد (ورکو و همکاران ۲۰۱۰). همچنین میزان توده‌ی میکروبی تولیدی و راندمان سنتز توده‌ی میکروبی نیز بر اساس معادله‌ی (۲) و بر اساس روش ماکار (۲۰۱۰) محاسبه شد (ماکار ۲۰۱۰) که در این معادله، MMY معادل میلی‌گرم توده‌ی میکروبی تولید شده، NG معادل میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون و ۲/۲ نیز ضریب استوکیومتری می‌باشد. معادله‌ی (۲):

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

رنگ‌آمیزی پروتوزوآ بر اساس روش ایوان و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد و شمارش آن‌ها نیز بر اساس روش ارائه شده توسط اگمیتو و ایمای (۱۹۸۱) انجام شد. راندمان سنتز توده‌ی میکروبی از تقسیم توده‌ی میکروبی تولیدی بر ماده‌ی آلی حقیقی هضم شده محاسبه شد.

برآوردها و آنالیز آماری داده‌ها

در این آزمایش از مدل آماری $Y_{ij}=\mu+T_i+e_{ij}$ استفاده شد که در آن Y_{ij}= مقدار هر مشاهده، μ= میانگین کل، T_i= اثر تیمار و e_{ij}= خطای آزمایشی بودند. همچنین داده‌های این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌کمک نرم‌افزار SAS (۲۰۰۲) آنالیز شدند (ورژن ۹/۲). اختلاف آماری بین تیمارها در سطح ۵ درصد و با آزمون دانکن تعیین شد. داده‌های آزمون گاز با کمک معادله‌ی، $P = b(1 - e^{-ct})$ آنالیز شدند که در آن، P= 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 ماده‌خشک)، c= ثابت نرخ تولید گاز برای b (درصد در ساعت) و t= زمان انکوباسیون (ساعت) بودند (ارسکو و مکدونالد ۱۹۷۹).

نتایج و بحث

غلظت نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوای محیط کشت تحت تأثیر افزودن اسانس بالنگو به محیط کشت قرار نگرفتند ولی pH محیط کشت با افزایش اسانس و نیز غلظت اسیدهای چرب فرار کل (TVFA)، به‌ترتیب کاهش (خطی، P=۰/۰۲) و افزایش (خطی، P=۰/۰۳) معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲). اسانس‌های روغنی حاصل از گیاهان دارویی اغلب دارای ترکیبات ضدمیکروبی بوده و زمانی استفاده از آن‌ها در تغذیه‌ی نشخوارکنندگان قابل قبول بوده که استفاده از دوزهای مربوطه علاوه بر داشتن اثرات مثبت، نتایج متغایر بر تخمیر شکمبه‌ای نداشته باشند (کونر ۱۹۹۳). افزودن یک اسانس تجاری به یک محیط کشت منجر به افزایش TVFA شد، هرچند که تک‌تک اسیدهای چرب فرار دستخوش تغییرات نشدند (کاستیلجوس و همکاران ۲۰۰۶). در مطالعه‌ای، از چندین اسانس روغنی در یک محیط کشت ثابت استفاده شد تا بهترین نوع اسانس و بهترین سطح آن مشخص گردد و گزارش شد که اسانس‌هایی دارای اثرات مثبت بوده که بتوانند شرایط تخمیر را در شکمبه در جهت تولید بیشتر TVFA (بویژه افزایش تولید پروپیونات و کاهش تولید استات) و نیز تولید کمتر نیتروژن آمونیاکی تغییر دهند (کاستیلجوس و همکاران ۲۰۰۶). در مطالعه‌ی حاضر، افزودن اسانس بالنگو منجر به تغییر در مهمترین فرآورده‌ی تخمیر نهایی شکمبه‌ای همراه با کاهش pH محیط کشت شد. مطالعات قبلی نشان داده که اغلب اسانس‌ها در اثر استفاده از دوزهای بالای آن‌ها (۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر)، دارای اثرات مهارکنندگی تخمیر از طریق تأثیر بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها و متعاقباً کاهش تولید TVFA، بوده‌اند (کاردوزو و همکاران ۲۰۰۵، کاستیلجوس و همکاران ۲۰۰۶ و بوسکوت و همکاران ۲۰۰۶). اسانس‌های روغنی ترکیبی از چند نوع مواد مختلف از جمله ترپن‌ها، فنیل پروپانوئیدها و سایر موادی بوده که با هدف‌های مختلفی کاربرد دارند، به‌طوری‌که در دهه‌های اخیر، مطالعات بیشماری برای ارزیابی ویژگی ضد باکتری آن‌ها انجام شده است (جانسن و همکاران، ۱۹۸۷ و ریسی و همکاران ۲۰۰۵). تعداد ۳۷ ترکیب در اسانس روغنی حاصل از بخش‌های هوایی بالنگو شناسایی شده‌اند که مهمترین آن‌ها شامل ترانس-پینوکارویل استات (۲۶ درصد)، پینوکاروون (۲۰ درصد)، بتاپینن (۱/۵ درصد)، بتا اسیمن (۴/۱ درصد)، ترپینولن (۱/۱ درصد)، لینالول (۳/۴ درصد)، ترانس پینوکاروئول (۱/۶ درصد)، ۳-توجن-۲-وان (۵/۱ درصد)، میرتنال (۱/۵ درصد)، وربنون (۷/۱ درصد)، ترانس-کاروئول (۵/۳ درصد)، سیس-کاروئول (۳/۵ درصد)، پولگون (۴/۴ درصد)، کارواکرول (۱/۶ درصد)، دی هیدرو کارویل استات (۲/۵ درصد) و بتا-کوبین (۲/۱ درصد) می‌باشند (شریفی راد و همکاران ۲۰۱۵). با توجه به وجود دو جزء اصلی شناسایی شده در اسانس بالنگو با نام‌های ترانس-پینوکارویل استات و پینوکاروون، گزارش گردید که این دو ترکیب در گیاه *Myrothamnus flabellifolius* به‌وفور وجود داشته و اسانس گیاهی آن دارای اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی دارند (ویلجون و همکاران ۲۰۰۲). در مطالعه‌ی دیگری، عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس حاصل از بخش‌های هوایی بالنگو که از دو منطقه‌ی همدان و آذربایجان غربی جمع‌آوری شده بودند، به‌ترتیب شامل جرماکرین دی (۴۲/۵ و ۴۹/۹ درصد برای همدان و آذربایجان غربی)، بتا-کاریوفیلن (۲۰/۶ و ۲۶ درصد)، جرماکرین بی (۵/۶ و ۱/۶ درصد)، بتا-المن (۰/۲ و ۵/۱ درصد) و آلفا-فارنسن (۴/۲ و ۰/۳ درصد) بودند (سفیدکن و همکاران ۲۰۰۶). اثرات ضدباکتریایی بالنگو گزارش شده است (محمود و همکاران ۲۰۱۳) ولی اینکه کدامیک از ترکیبات موجود در اسانس بالنگو دارای اثر ضدباکتریایی می‌باشد، ناشناخته مانده است. مطالعات بسیاری نشان داده که استفاده از اسانس‌های روغنی، تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط شکمبه در شرایط حیوان زنده نداشته است که در توافق با گزارش

مطالعه‌ی حاضر می‌باشد (بنچار و همکاران ۲۰۰۸ و فاندینو و همکاران ۲۰۰۸).

متعادل کردن تخمیر شکمبه برای بالا بردن راندمان استفاده از نیتروژن و کاهش رهاسازی آن به محیط زیست ضروری می‌باشد. همچنین دستکاری اکوسیستم میکروبی شکمبه در جهت کاهش تولید متان و کاهش دفع نیتروژن توسط نشخوارکنندگان در جهت بهبود عملکرد این دام‌ها برای متخصصین تغذیه‌ی دام، نیز ضروری به‌نظر می‌رسد. گزارش شده است که اسانس‌های روغنی می‌توانند نیتروژن آمونیاکی تولید شده در شکمبه را کاهش داده و از این طریق باعث بهبود جذب نیتروژن رها شده از اسیدهای آمینه‌ی موجود در خوراک گردند (پاترا و سکسنا ۲۰۰۹). این کاهش در تولید آمونیاک که معمولاً همراه با کاهش ایزواسیدها می‌باشد، در اثر کاهش تجزیه‌ی پروتئین در شکمبه رخ می‌دهد (الکساندر و همکاران ۲۰۰۸). با وجود اینکه جمعیت پروتوزوآی مطالعه‌ی حاضر تحت تأثیر افزودن اسانس بالنگو قرار نگرفت ولی عنوان شده است که پروتوزوآ نقش مهمی در تولید یون‌های هیدروژن موجود در شکمبه را دارا می‌باشد (بهاتا و همکاران ۲۰۱۳). علاوه بر این یک ارتباط فیزیکی بین سلول‌های پروتوزوا و باکتری‌های متانوژنز در شکمبه وجود دارد که به انتقال هیدروژن کمک شایان توجهی می‌نمایند (بهاتا و همکاران ۲۰۱۳).

پروتوزوآی شکمبه‌ای از طریق فعالیت‌های تشدید کنندگی‌شان، از یک طرف باعث فراهم کردن هیدروژن برای باکتری‌های متانوژنز و تولید متان شده و از طرف دیگر از طریق خاصیت بیگانه‌خواری که دارند، شمار زیادی از باکتری‌های شکمبه را مصرف می‌نمایند (مورگاوی و همکاران ۲۰۱۰). گیاهان گرمسیری دارای موادی همچون تانن و ساپونین بوده که مصرف آن‌ها منجر به کاهش جمعیت پروتوزوآ شده و متعاقباً کاهش در تولید متان و نیتروژن آمونیاکی را در پی داشته است (لیلا و همکاران ۲۰۰۳). در مطالعه‌ای گزارش گردید که مصرف دوزهای بالاتر بسیاری از روغن‌ها (۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر) منجر به کاهش غلظت‌های TVFA و نیتروژن آمونیاکی شده، به‌طوری‌که که نسبت‌های متفاوتی از باکتری‌کشی در غلظت‌های متفاوت آن‌ها گزارش شد (هارت و همکاران ۲۰۰۸). در اثر کاربرد اوژنول (ترکیب موجود در برخی اسانس‌های روغنی) به‌مقدار ۰/۳ و ۳ میلی‌گرم در لیتر در یک محیط کشت آزمایشگاهی، غلظت نیتروژن آمونیاکی تمایل به افزایش نشان داد، هرچند که کاربرد سطوح متوسط آن (۳۰ میلی‌گرم/لیتر) تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی نداشته، ولی کاربرد سطوح بالاتر آن (۳۰۰، ۳۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر) به‌طور معنی‌داری باعث کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت گردید (کاردوزو و همکاران ۲۰۰۵). میانگین pH مایع شکمبه در شرایطِ حیوان زنده معادل ۷/۱ گزارش شد که بعد از خوراک دادن حیوانات، همانطور که مدنظر بود کاهش یافته ولی تحت تأثیر افزودن اسانس به جیره قرار نگرفت (نیوبولد و همکاران ۲۰۰۴). همچنین نیوبولد و همکاران (۲۰۰۴)، گزارش کردند که استفاده از اسانس روغنی هیچ تأثیری بر pH شکمبه‌ی در شرایط حیوان زنده ندارد. در مطالعه‌ای، کاهش پروتوزوآ، کاهش نیتروژن آمونیاکی را به‌دنبال داشت و عنوان شد که جمعیت پروتوزوآ، اولین تولید کننده‌های آمونیاک در شکمبه محسوب می‌شوند (فرانسیس و همکاران ۲۰۰۲).

Table 2- Effect of different doses of *Lallemantia royleana* essential oil on some of the fermentation parameters in an *in vitro* batch culture

Dose (mg/L)	Ammonia-nitrogen (mg/dL)	TVFA (mmol/L)	pH	Protozoa ($\times 10^5$/ml)
0 (Control)	28.12	33.37^{b}	6.74^{a}	3.60
150	28.5	36.50^{ab}	6.76^{a}	3.52
300	27.31	38.75^{a}	6.69^{ab}	3.30
450	27.17	39.62^{a}	6.64^{b}	2.90
SEM	0.56	1.27	0.03	0.38
		P-Value		
Linear	0.13	0.003	0.02	0.20
Cubic	0.65	0.39	0.21	0.68
Quadratic	0.31	0.93	0.45	0.99

Means without a common letter within a column differ significantly (P<0.05).
The fermentation parameters of this table were measured after 96 h of incubation.
TVFA: total volatile fatty acids.

اغلب فراسنجه‌های تولید گاز (شامل تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون و پتانسیل تولید گاز) با افزایش سطوح اسانس بالنگو در محیط کشت، به‌طور معنی‌داری (خطی و درجه دو) افزایش نشان دادند هر چند در مقابل، ثابت نرخ تولید گاز کاهش و تولید متان نیز تغییری ننمود (جدول ۳). بیشترین میزان تولید تجمعی گاز در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون (شکل ۱) مربوط به سطوح ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس بالنگو بود و به‌نظر می‌رسد که در زمان‌های پایین‌تر انکوباسیون (تا زمان ۶ ساعت انکوباسیون)، تولید تجمعی گاز در بین سطوح مختلف اسانس و شاهد یکسان بوده ولی در زمان‌های بالاتر انکوباسیون، میزان تولید گاز برای تیمارهای دارای سطوح مختلف اسانس، افزایش بیشتری نسبت به تیمار شاهد نشان داده‌اند (شکل ۱).

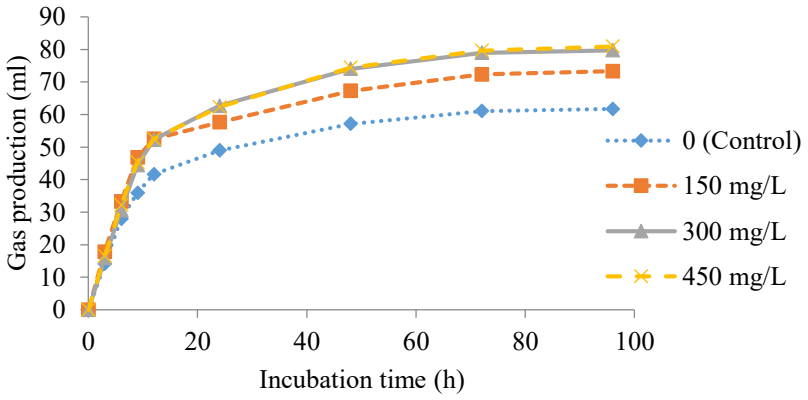

Figure 1- The procedure of gas production by adding different levels of *Lallemantia royleana* essential oil to an *in vitro* batch culture

بسیاری از محققین از تکنیک تولید گاز به‌جهت ارزان و راحتی اجرای آن، برای تعیین فرآیند تخمیر برخی از مواد افزوده شده به محیط کشت در شرایط آزمایشگاهی استفاده کرده‌اند (حسین‌زاده و همکاران ۲۰۱۹، بیابانی و همکاران ۲۰۱۹ و کاظمی و همکاران ۲۰۱۹).

کاهش تولید متان از آن جهت با اهمیت بوده که تولید آن در نشخوارکنندگان می‌تواند ۱۲-۲ درصد از انرژی خام موجود در خوراک را هدر دهد (جانسون و جانسون ۱۹۹۵). علاوه بر این متان از دسته‌ی گازهای گلخانه‌ای محسوب می‌شود که ۲۳ برابر بیشتر از دی‌اکسیدکربن می‌تواند باعث گرمتر شدن کره‌ی زمین گردد (هیئت بین دولتی تغییر اقلیم ۲۰۰۱). باکتری‌های متانوژنز شکمبه‌ای، هیدروژن تولید شده در طی فرآیند تخمیر را مصرف کرده تا از این طریق بتوانند تولید متان را جایگزین تولید

دی‌اکسیدکربن نمایند (مورگاوی و همکاران ۲۰۱۰). با وجود تمایل به معنی‌دار شدن تولید متان و یا جمعیت پروتوزوآ در مطالعه‌ی ما، ولی گزارش شده است که تولید متان زمانی‌که پروتوزوآ وجود داشته و یا جمعیت آن بیشتر شود، افزایش می‌یابد (جونی و لاسالاس ۱۹۹۷). در مقابل هس و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که تنها نسبت کوچکی از کل متان تولیدی مربوط به‌حضور متانوژنزهای مرتبط با پروتوزوآی مژکدار می‌باشد. تولید گاز و متان تولیدی در اثر استفاده از برخی ترکیبات موثره‌ی موجود در اسانس‌های روغنی (مثل کارواکرول، اوژنول، سیترال و سینامالدئید) در محیط کشت، نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان دادند (لین و همکاران ۲۰۱۳) که در تناقض با گزارش ما می‌باشد.

Table 3- Effect of different doses of *Lallemantia royleana* essential oil on some gas production parameters and methane production in an *in vitro* batch culture

Dose (mg/L)	b_{gas} (ml)	c_{gas} (٪/h)	Gas 12 h (ml)	Gas 24 h (ml)	Gas 48 h (ml)	Gas 72 h (ml)	CH_4 (ml)
0 (Control)	59.39^{c}	0.108^{a}	41.65^{b}	48.95^{c}	57.14^{c}	61.09^{c}	14.31
150	69.89^{b}	0.097^{b}	52.52^{a}	57.62^{b}	67.27^{b}	72.35^{b}	13.55
300	77.50^{a}	0.086^{c}	52.25^{a}	62.67^{a}	74.05^{a}	78.95^{a}	13.79
450	77.98^{a}	0.087^{c}	52.53^{a}	62.32^{a}	74.42^{a}	79.67^{a}	13.24
SEM	0.65	0.001	0.52	0.59	0.62	0.64	0.35
				P-Value			
Linear	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.08
Cubic	<0.0001	0.008	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.63
Quadratic	0.17	<0.0001	0.0003	0.52	0.30	0.68	0.33

Means without a common letter within a column differ significantly (P<0.05).
Methane (CH_4) was measured after 24 h of incubation; Gas 12, 24, 48, and 72 h: cumulative gas production after 12, 24, 48, and 72 h of incubation, respectively; c_{gas}: constant rate of gas production; b_{gas}: potential gas production.

ضریب تفکیک‌پذیری، تولید توده‌ی میکروبی و راندمان سنتز توده‌ی میکروبی به‌طور معنی‌داری در تیمارهای دارای اسانس بالنگو نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد (جدول ۴) ولی در مقابل تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در تیمارهای حاوی اسانس (به‌ویژه تیمار ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم/لیتر) افزایش معنی‌داری نشان داد (خطی و درجه دو). اثرات اسانس‌های روغنی بیشتر بستگی به ترکیبات موجود در آن‌ها دارد (پاترا و سکسنا ۲۰۰۹). به‌خاطر شناسایی تعداد بیشماری از ترکیبات موثره‌ی فعال در اسانس‌های گیاهی، مکانیسم‌های متنوعی در خصوص اثرات آن‌ها بر رشد و جمعیت باکتری‌ها گزارش شده است (کالسامیگلیا و همکاران ۲۰۰۷). برای مثال، کارواکرول موجود در اغلب اسانس‌های گیاهی، به‌عنوان یک حامل کاتیون‌های منووالان (مثل K) از طریق تبادل با پروتون‌های موجود بر روی گروه‌های هیدروکسیل خود (از گروه فنولیک) در فضای عرضی سلول‌های اغلب باکتری‌ها عمل کرده و در نهایت باعث کاهش سنتز ATP شده و از این طریق باعث مرگ سلول‌ها می‌گردد (بوسکوت و همکاران ۲۰۰۶). گروه کربونیل موجود بر روی سینامالدئید که در برخی از اسانس‌های روغنی وجود دارد، اجازه‌ی ورود این دسته از ترکیبات را به غشای پریپلاسم برخی از باکتری‌ها فراهم می‌کند (هلاندر و همکاران ۱۹۹۸). به‌نظر می‌رسد که در مطالعه‌ی فعلی، اسانس بالنگو دارای اثرات کاهشی فراوانی بر جمعیت باکتری‌های موجود در محیط کشت داشته که در نهایت منجر به کاهش تولید توده‌ی میکروبی شده است. همچنین گروه اتری حلقه‌ی آروماتیک آنتول، مسئول فعالیت ضد میکروبی آن می‌باشد (داویدسون و نایدو ۲۰۰۰). کاهش فعالیت آمیلاز و پروتئاز باکتریایی در حضور اسانس‌های روغنی، دلالت بر این دارد که آن‌ها می‌توانند کلنی‌سازی باکتری‌های مربوطه و در نهایت هضم مواد سهل‌التخمیر را کاهش داده بدون اینکه تأثیری بر هضم الیاف خام بگذارند (هارت و همکاران ۲۰۰۸). به‌نظر می‌رسد که اثر اسانس‌های روغنی بر تجزیه‌پذیری نشاسته و یا پروتئین، انتخابی باشد، به‌طوری‌که مولرو و همکاران (۲۰۰۴)، دریافتند که

اسانس روغنی، نرخ تجزیه‌پذیری کنجاله‌ی آفتابگردان و نخود سبز را کاهش داده اما تأثیری بر هضم کنجاله‌ی سویا، پودر ماهی و دانه‌های لوبیا نداشت. نیوبولد و همکاران (۲۰۰۴)، متوجه شدند که اسانس روغنی، نرخ تجزیه‌پذیری ماده خشک کنجاله‌ی سویا را کاهش داده ولی تأثیری بر قابلیت هضم کنجاله‌ی کلزا یا علوفه‌ی خشک در شکمبه‌ی گوسفندان نداشت. اگر چه که در مطالعه‌ی حال حاضر از جیره‌ی TMR استفاده شد، ولی تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در تیمارهای دارای اسانس بالنگو نسبت به تیمار شاهد افزایش یافتند. در تناقض با مطالعه‌ی ما، ضریب تفکیک‌پذیری که دلالت بر بازده تولید توده‌ی میکروبی دارد، با افزودن اسانس روغنی به محیط کشت، افزایش یافت (پاوار و همکاران ۲۰۱۴). در این مطالعه، ضریب تفکیک‌پذیری در واقع از تقسیم ماده آلی حقیقی هضم شده بر تولید تجمعی گاز محاسبه شد و پایین‌تر بودن PF در تیمارهای دارای اسانس بالنگو بدین معناست که سهم کمتری از ماده آلی تجزیه شده در تولید توده‌ی میکروبی مشارکت داشته است و این به معنیِ کاهش بازدهی سنتز توده‌ی میکروبی در این مطالعه برای تیمارهای فوق می‌باشد.

Table 4- Effect of different doses of *Lallemantia royleana* essential oil on dry matter and organic matter degradability and some microbial parameters

Dose (mg/L)	IVDMD (%)	IVOMD (%)	EMMS (%)	MMY (mg)	PF_{96}
0 (Control)	75.84^{c}	79.31^{c}	25.99^{a}	47.69^{a}	2.97^{a}
150	75.31^{c}	82.85^{b}	12.42^{b}	22.86^{b}	2.51^{b}
300	77.95^{b}	83.88^{ab}	4.78^{c}	8.81^{c}	2.31^{c}
450	80.49^{a}	85.76^{a}	3.59^{c}	6.63^{c}	2.28^{c}
SEM	0.61	0.87	0.77	1.41	0.02
		P-Value			
Linear	<0.0001	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Cubic	0.03	0.05	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Quadratic	0.26	0.40	0.88	0.86	0.44

Means without a common letter within a column differ significantly (P<0.05).
IVDMD: *In vitro* dry matter degradability; IVOMD: *In vitro* organic matter degradability; EMMS: Efficiency of microbial mass synthesis; MMY: Microbial mass yield; PF_{96}: Partitioning factor (mg true organic matter degradability/ml gas produced at 96 h). The fermentation parameters of this table were measured after 96 h of incubation.

اگرچه که PF بالا همراه با کاهش متان در مطالعه‌ای مشاهده شد (بلومل و همکاران ۲۰۰۳)، اما در مطالعه‌ی حاضر کاهش PF همراه با عدم تغییرات در تولید متان مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که اسانس روغنی بالنگو می‌تواند باعث ایجاد تغییرات در الگوی تخمیر شکمبه‌ای در راستای افزایش تولید مهمترین محصول نهایی تخمیر یعنی TVFA گردد. اگرچه که غلظت TVFA، IVDMD و IVOMD و نیز کلیه‌ی فراسنجه‌های تولید گاز (بجز c_{gas}) با افزایش اسانس بالنگو به محیط کشت، افزایش نشان دادند ولی در مقابل ضریب تفکیک‌پذیری، تولید توده‌ی میکروبی و راندمان سنتز توده‌ی میکروبی کاهش معنی‌داری در برابر تیمار شاهد نشان دادند. همچنین اسانس بالنگو نتوانست، جمعیت پروتوزوآ و یا تولید متان را دستخوش تغییرات نماید، هر چند که تمایل برای کاهش تولید متان در نتیجه‌ی افزودن بالنگو به‌ویژه در سطوح بالاتر آن (۴۵۰ میلی‌گرم/لیتر) وجود داشت. در مجموع به‌نظر می‌رسد که شناسایی اثرات اسانس بالنگو نیازمند آزمایشات تکمیلی بیشتر هم بر روی حیوان زنده و هم در شرایط متفاوت آزمایشگاهی نیز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل طرح پژوهشی مصوب در مجتمع آموزش عالی تربت‌جام بوده، لذا نویسنده‌ی مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از این مجتمع ابراز می‌دارد.

منابع مورد استفاده

Alexander G, Singh B, Sahoo A and Bhat T, 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.

Barnett AJG and Reid R, 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.

Benchaar C, McAllister TA and Chouinard PY, 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. Journal of Dairy Science, 91: 4765-4777.

Bhatta R, Saravanan M, Baruah L, Sampath KT and Prasad CS, 2013. Effect of plant secondary compounds on *in vitro* methane, ammonia production and ruminal protozoa population. Journal of Applied Microbiology 115 (2): 455-65.

Biabani N, Fattahnia F, Taasoli G, Bahrami M and Mirzaei HR, 2019. Effect of adding different levels of barley on gas production parameters, protozoa population, and silage quality of mint pulp silage and chicory pulp silage. Journal of Animal Science Researches 29 (2): 31-42. (In Persian).

Blummel M, Karsli A and Russell JR, 2003. Influence of diet on growth yield of rumen microorganisms *in vitro*: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. British Journal of Nutrition 90: 625-634.

Bozorgi M and Vazirian M, 2016. Antioxidant activity of *Lallemantia royleana* (Benth.) seed extract. Traditional and Integrative Medicine 1 (4): 147-150.

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

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

Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L and Ferret A, 2007. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science 90: 2580-2595.

Cardozo PW, 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.

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

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

Castillejos L, Calsamiglia S, Martın-Tereso J and Ter Wijlen H, 2008. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. Animal Feed Science and Technology 145: 259-270.

Conner DE, 1993. Naturally occurring compounds. In: Davidson, P.M., Branen, A.L. (Eds.). Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker, New York, NY, USA. pp: 441-468.

Cowan MM, 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12: 564-582.

Davidson P and Naidu A, 2000. Phyto-phenols. In: Naidu, A.S. (Eds.), Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp: 265-294.

Evans JD and Martin SA, 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. Current Microbiology 41: 336-340.

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

Fievez V, Babaymo OJ and Demeyer D, 2005. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. Animal Feed Science and Technology 123: 197-210.

Francis G, Kerem Z, Makkar HPS and Becker K, 2002. The biological action of saponins in animal systems: reviews. British Journal of Nutrition 88: 587-605.

Getachew G, Robinson PH, DePeters EJ and Taylor SJ, 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.

Hart KJ, Yanez-Ruiz DR, Duval SM, McEwan NR and Newbold CJ, 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology 147: 8-35.

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Mol I, Smid EJ, Gorris LGM and Wright AV, 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 3590-3595.

Hess HD, Kreuzer M, Diaz TE, Lascano CE, Carulla JE and Solvia CR, 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated fluid. Animal Feed Science and Technology 109: 79-94.

Hoseinzadeh SA, Farivar F, Bayat Koohsar J and Ghanbari F, 2019. Effect of physical and biological processing methods of corn grain on *in vitro* gas production and fermentation. Journal of Animal Science Researches 29 (2): 103-115. (In Persian).

IPCC. 2001. Climate Change 2001: The Scientific Basis, Cambridge Univ. Press, New York.

IPCC. 2007. Summary of polymakers. In: Solomon, S, Quin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (Eds.), Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.

Ivan M, Mir PS, Koenig KM, Rode LM, Neill L, Entz T and Mir Z. 2001. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. Small Ruminant Research 41: 215-227.

Janssen AM, Scheffer JJ and Baerheim Svendsen A, 1987. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. Planta Medica 53 (5): 395-398.

Johnson KA and Johnson DE, 1995. Methane emissions from cattle. Journal of Animal Science 73: 2483-2492.

Jouany JP and Lassalas B, 1997. Study of the adaptation of the rumen ecosystem to the antimethanogenic effect of monensin measured *in vivo*. Reproduction Nutrition Development 37 (suppl.1): S69-S70.

Kazemi M and Valizadeh R, 2019. Nutritional potential of four plant species (*Arctium lappa*, *Verbascum thapsus*, *Althaea officinalis* and *Ferula hermonis*) in Razavi Khorasan rangelands. Iranian Journal of Range and Desert Research 26 (3): 351-360. (In Persian).

Khare CP, 2007. Indian medicinal plants. Springer, Berlin, Germany. 360p.

Komolong MK, Barber DG and McNeill DM, 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.

Lila ZA, Mohammed N, Kanda S, Kamada T and Itabashi H, 2003. Effect of sarsaponin on rumen fermentation with particular reference to methane production *in vitro*. Journal of Dairy Science 86: 3330-3336.

Lin B, Wang JH, Lu Y, Liang Q and Liu JX, 2013. *In vitro* rumen fermentation and methane production are influenced by active components of essential oils combined with fumarate. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 97 (1): 1-9.

Mahmood S, Hayat MQ, Sadigh A, Ishtiagh S, Malik S and Ashraf M, 2013. Antibacterial activity of *Lallemantia royleana* (Benth.) indigenous to Pakistan. African Journal of Microbiology Research 7 (31): 4006-4009.

Makkar HPS, 2010. In: *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants. *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. Nuclear and related methodologies (Ed.). New York, Springer, New York, USA. pp: 106-144

McGuffey RK, Richardson LF and Wilkinson JID, 2001. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. Journal of Dairy Science 84 (E. Suppl.): E194-E203.

Menke KH and Steingass H, 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.

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

Morgavi DP, Forano E, Martin C and Newbold CJ, 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. Animal 4 (7): 1024-1036.

Newbold CJ, McIntosh FM, Williams P, Losa R and Wallace RJ, 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology 114: 105-112.

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.

Ogimoto K and Imai S, 1981. Atlas of rumen microbiology. 1st Edition. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.

Ørskov ER and McDonald I, 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.

Patra AK 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. Nutrition Research Reviews 22: 204-219.

Pawar MM, Kamra DN, Agarwal N and Chaudhary LC, 2014. Effects of essential oils on *in vitro* methanogenesis and feed fermentation with buffalo rumen liquor. Agricultural Research 3 (1): 67-74.

Payvastegan S, Farhoomand P, Talatapeh A and Sahraei M, 2013. The effects of different levels of summer savory (*Satureja Hortensis* L.) dry powder and essential oil on performance, ruminal fermentation and blood metabolites of west Azerbaijan native kids. Animal Science Journal (Pajohesh and Sazandegi) 105: 53-66. (In Persian).

Razavi SMA, Cui SW and Ding H, 2016. Structural and physicochemical characteristics of a novel water-soluble gum from *Lallemantia royleana* seed. International Journal of Biological Macromolecules 83: 142-151.

Razavi SMA, Mohammadi Moghaddam T and Amini AM, 2008. Physical-mechanical properties and chemical composition of Balangu (*Lallemantia royleana* (Benth. in Walla.)) seed. International Journal of Food Engineering 4: 1-10.

Ricci D, Fraternale D, Giamperi L, Bucchini A, Epifano F, Burini G and Curini M, 2005. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (*Lamiaceae*). Journal of Ethnopharmacology 98 (1): 195-200.

Rostamzadeh H, Pir Mohammadi R and Alijoo Y, 2014. Effect of Ajowan plant essential oil (*cariumcopticum*) on performance and some blood parameters of Mahabadi goats at early lactation period. Pajohesh and Sazandegi 106: 103-110. (In Persian).

Sahraei Belverdy M and Pirmohammadi R, 2015. Effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils on digestibility, blood and rumen parameters of Ghezel sheep. Animal Science Journal (Pajohesh and Sazandegi) 103: 71-82. (In Persian).

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

Sefidkan F, Sonboli A and Kalvandi R, 2006. Analysis of the essential oil of *Lallemantia peltata* from Iran. Journal of Essential Oil-Bearing Plants 9 (1): 42-46.

Sharifi-Rad J, Hoseini-Alfatemi SM, Sharifi-Rad M and Setzer WN, 2015. Chemical composition, antifungal and antibacterial activities of essential oil from *Lallemantia Royleana* (Benth. in Wall.) Benth. Journal of Food Safety 35 (1): 19-25.

Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB and France J, 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. Animal Feed Science and Technology 48: 185-197.

Vercoe EP, Makkar HPS and Schlink AC, 2010. *In vitro* screening of plant resources for extra nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies (Ed.), *in vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis, Springer, New York, USA. pp: 106-144.

Viljoen AM, Klepser ME, Ernst EJ, Keele D, Roling E, Van Vuuren S, Demirci B, Baser KHC, Van Wyk BE and Jager AK, 2002. The composition and antimicrobial activity of the essential oil of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*. South African Journal of Botany 68: 100-105.

Wallace RJ, 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proceedings of the Nutrition Society 63: 621-629.

Zargari A, 1996. Medicinal plants. 4th edition. Tehran: Tehran University of Medical Sciences Publication.114p.

Laboratory study of Balangu (*Lallemantia royleana*) essential oil effects on gas production kinetic, degradability, protozoan population, and some fermentation parameters of a balanced diet

M Kazemi[1*]

Received: September 3, 2019 Accepted: November 9, 2019
[1]Assistant professor, Department of Animal Science, Higher Education Complex of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran
[*]Corresponding Author: Email: phd1388@gmail.com

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Researches

Journal of Animal Science/vol.30 No.1/ 2020/pp 29-43
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/AS.2020.11001

Introduction: Nowadays, using antibiotics in ruminant feeding as growth promoters has been restricted due to the appearance of multi-drug resistant bacteria which may be a risk to human health. Recently, many efforts have been allocated to develop secure and safe alternatives to antibiotics. On the other hand, the identity of molecules that modulate rumen fermentation to enhance the efficiency of feed conversion ratio is an important objective of ruminant nutrition research. The manipulation of the rumen microbial ecosystem to increase the efficiency of nutrients used by the animal has long been a goal for rumen microbiologists and nutritionists. Essential oils are aromatic oily fluids collected from plants, which can be used as natural additives in animal feeds because of their antibacterial, antifungal, and antioxidant aspects (Cowan 1999). The essential oils are volatile mixtures composed of secondary metabolites of plant material which are characterized by diverse compositions and activities (Benchaar et al. 2008). It is reported that many essential oils affect rumen fermentation (Hart et al. 2008) and they are currently being studied as rumen modifiers in ruminants. The antimicrobial effects of common essential oils extracted from medicinal plants have been proved, previously (Castillejos et al. 2006). Castillejos et al. (2005) showed that the addition of some essential oils into two different diets (high forage or high concentrate) in a continuous culture fermentation system during eight days increased TVFA concentration, but nitrogen metabolism did not differ. Therefore, the effect of using different levels of *Lallemantia royleana* essential oil (LREO) on some of the fermentative-microbial parameters, *in vitro* dry matter and organic matter degradability, gas production parameters, protozoa population, and methane emissions of a sheep's diet were investigated in an *in vitro* batch culture.

Material and methods: The whole samples of Balangu (*Lallemantia royleana*) were collected from the mountainous areas (Revenj village) of Torbat-e Jam at the flowering stage. The essential oil from whole parts of this plant was extracted by Clevenger's hydro-distillation apparatus. An *in vitro* batch culture was used to evaluate the effects of different levels of essential oil (0, 150, 300, and 450 mg/L) in the laboratory. The cumulative gas production at 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, and 96 h of incubation was measured and recorded. The *in vitro* dry matter (IVDMD) and organic matter (IVOMD) digestibilities were measured according to standard methods after 96 h of incubation. Some of the fermentative-microbial parameters [including pH, ammonia nitrogen, total volatile fatty acids (TVFA), microbial mass yield (MMY), partitioning factor (PF), and efficiency of microbial mass synthesis (EMMS)], methane emissions, and protozoa population were also determined in an *in vitro* batch culture similar to that used for gas production test according to standard methods.

Results and discussion: No changes were observed in the concentration of ammonia nitrogen and protozoal population of the culture medium due to the addition of LREO, but pH (linear, P=0.02) and TVFA significantly decreased and increased, respectively compared with the control group. With increasing LREO in the culture medium, most gas production parameters (potential gas production and gas production at 12, 24, 48, and 72 h of incubation) significantly increased as linear and quadratic; however, methane emissions did not change. Although IVDMD and IVOMD showed a significant increase (linear and quadratic) due to the addition of LREO; in contrast, the PF, MMY, and EMMS significantly decreased (linear and quadratic) compared with the control group. Supplementation of 5 mg/l of some essential oils increased by 8% the concentration of total VFA (Castillejos et al. 2007). Evans and Martin (2000) reported that thymol (400 mg/l) decreased the total VFA concentration, suggesting that the used dose was toxic to rumen bacteria. Previous studies (Molero et al. 2004 and Newbold et al. 2004) demonstrated that a blend of essential oils inhibited proteolysis and amino acid deamination. Recent studies showed that most essential oils tested at high concentrations (i.e., 3000 and 5000 mg/l) inhibited rumen microbial fermentation and reduced total VFA concentration, which demonstrates their antimicrobial activity (Cardozo et al. 2005, Busquet et al. 2006, Castillejos et al. 2006).

Conclusion: The overall results showed that LREO can alter the fermentation pattern in the medium by improving some of the parameters (increasing in gas yield, TVFA, IVDMD, and IVOMD), and it seems that the level of 450 mg of LREO/L has more effect on these parameters. The addition of LREO can also decrease the microbial mass yield in the rumen, modify the production of VFA without any change in ammonia nitrogen. Effects of LREO on *in vivo* rumen fermentation and animal performance require further researches.

Key words: Feed additive, Fermentation pattern, *In vitro* batch culture, Medicinal plant