نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد اول، شماره سوم، ۱۳۹۲
http://ejrr.gau.ac.ir

بررسی اثر اسانس روغنی زنیان (*Carumcopticum*L.) بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی

راضیه طالب‌زاده[۱]، *داریوش علیپور[۲]، محمدجمال سحرخیز[۳] و مصطفی ملکی[۲]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و [۲]استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی
دانشگاه بوعلی‌سینا همدان، [۳]دانشیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۰

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر اسانس روغنی زنیان بر فراسنجه‌های تخمیر یک جیره گوسفند پرواری با استفاده از آزمون تولید گاز بود. بدین منظور سطوح مختلف اسانس زنیان (صفر، ۱۵۰، ۳۰۰، ٤٥٠ و ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به سرنگ‌های اندازه گیری گاز که حاوی جیره بودند، افزوده شد. در مرحله اول انکوباسیون به مدت ١٤٤ ساعت به طول انجامید و فراسنجه‌های حداکثر گاز تولیدی بالقوه یا نقطه مجانب منحنی تولید گاز (A)، فاز تاخیر (L) و تجزیه پذیری ماده خشک برآورد گردید. در مرحله دوم پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون مقدار گاز تولیدی، غلظت کل اسیدهای چرب فرار، آمونیاک، توده میکروبی، ضریب تفکیک و قابلیت هضم حقیقی ماده‌ی آلی اندازه‌گیری شد. افزودن اسانس زنیان باعث شد فراسنجه‌های A و تجزیه پذیری ماده‌ی خشک کاهش یابد و در مقابل فاز تاخیر افزایش یافت. استفاده از اسانس باعث افزایش توده میکروبی در سطوح ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با سایر تیمارها شد. ضریب تفکیک نیز تحت تاثیر اسانس زنیان به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. با افزایش دوز اسانس مورد استفاده قابلیت هضم حقیقی ماده آلی نیز کاهش یافت. به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس زنیان دارای فعالیت ضد میکروبی علیه میکروارگانیسم‌های شکمبه است و در سطوح بالا مهار کننده‌ی تخمیر است. این اسانس توانایی تغییر در تخمیر شکمبه‌ای را دارد و بهتر است اثرات آن در سطوح پایین تر بر تولید اسیدهای چرب و توده‌ی میکروبی مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: زنیان، تخمیر شکمبه‌ای، آزمون تولید گاز، توده میکروبی

---

*مسول مکاتبه: Alipourd@basu.ac.ir

مقدمه

یکی از راه‌کارهای افزایش تولیدات دامی استفاده از آنتی بیوتیک‌های یونوفر (مانند مونسین و لازولوسید) در جیره دام‌های نشخوار کننده است. یکی از اثرات مهم این ترکیبات تغییر جمعیت میکروبی شکمبه است که باعث می‌شود تا بازدهی استفاده از ترکیبات آلی در شکمبه افزایش یابد (هوبسون و استیوارت، ۱۹۹۷). اما در چند سال اخیر به‌دلیل نگرانی‌های بشر در مورد پدیدار شدن سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، استفاده از این ترکیبات در جیره دام و طیور در اتحادیه اروپایی ممنوع شده است (مجله رسمی اتحادیه اروپایی[1]، ۲۰۰۳). یکی از راه‌های جایگزین، استفاده از ترکیبات طبیعی و بی‌خطر مانند متابولیت‌های ثانویه است (کالسامیگلیا و همکاران، ۲۰۰۷). اسانس‌های روغنی از این دسته ترکیبات هستند و اخیراً پژوهش‌های زیادی در ارتباط با اثرات این مواد به عنوان تغییر دهنده‌های تخمیر در شکمبه صورت پذیرفته است (بنچار و همکاران، ۲۰۰۸الف). این ترکیبات که یکی از وظایف آن‌ها ایجاد رایحه در گیاهان است با استفاده از تقطیر با بخار[2] به‌دست می‌آیند (کالسامیگلیا و همکاران، ۲۰۰۷). اسانس‌های روغنی به‌دلیل دارا بودن ترکیبات متنوع تشکیل‌دهنده آن‌ها دارای اثرات متنوعی در تغذیه دام هستند (بنچار و همکاران، ۲۰۰۸الف).

گیاه زنیان (*Carum copticum*) متعلق به خانواده چتریان[3] یکی از این گیاهان دارویی است که در ایران، هند و مصر رشد می‌کند (دالکانی و همکاران، ۲۰۱۱). اسانس روغنی این گیاه دارای اثرات آنتی‌بیوتیکی علیه بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا است (آرورا و کاور، ۲۰۰۷). یکی از ترکیبات اصلی اسانس زنیان تیمول می‌باشد (گودرزی و همکاران، ۲۰۱۱) که اثرات تغییردهنده آن بر تخمیر شکمبه‌ای به اثبات رسیده است (بنچار و همکاران، ۲۰۰۸ب). اخیراً گزارش تعدادی از پژوهش‌ها در ارتباط با اثرات اسانس‌های روغنی بر تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی انتشار یافته است. تقوی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده نمودند استفاده از سطوح مختلف اسانس نعناع اخضر باعث تغییر شرایط تخمیر شکمبه‌ای به‌صورت وابسته به دوز شد. همچنین اگروال و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از اسانس نعناع فلفلی دریافتند که تولید متان در شرایط آزمایشگاهی کاهش یافت.

1- Official Journal of European Union
2- Steam distillation
3- Apiacaea

به نظر می‌رسد که ارزیابی گیاهان بومی ایران که اثرات آنتی بیوتیکی آن‌ها محرز است برای کاربرد در تغذیه نشخوارکنندگان ضروری است. لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر اسانس روغنی گیاه زنیان فراسنجه‌های تخمیر شکمبه، قابلیت هضم ماده‌ی آلی با استفاده از آزمون تولید گاز بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و آنالیز اسانس: اسانس زنیان از گیاه کامل (در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شیراز کشت شد) با استفاده از دستگاه کلونجر و در آزمایشگاه گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه شد.نمونه‌های آماده شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد ومناسب ترین برنامه ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس به دست آمد (طالب‌زاده و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین درصد ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس و شاخص بازداری هر ترکیب محاسبه گردید. سپس اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌نگار جرمی[1] (Thermoqust-Finnigan) تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها به دست آمد. شناسایی ترکیب‌های اسانس با استفاده از شاخص بازداری (کواتس) و بررسی طیف‌های جرمی هر یک از اجزای اسانس و مقایسه آن‌ها با طیف‌های مرجع انجام شد (آدام، ۲۰۰۷). ستون مورد استفاده در دستگاه کروماتوگراف از نوع DB-5 (آجیلنت، آمریکا) با طول ٦٠ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه‌ی داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر بود. از گاز هلیوم به عنوان حامل استفاده شد. برنامه دمایی ستون از ٦٠ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه شروع و با نرخ ٤ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۵۰درجه سانتی‌گراد رسید و به‌مدت ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد. در طیف نگار مورد استفاده انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و جریان یونیزاسیون ۱۵۰ میلی‌آمپر بود. در شروع آزمایش‌های ذیل اسانس در اتانول مطلق حل می‌شد و به نسبت ۱ درصد حجمی/حجمی به سرنگ‌های تولید گاز افزوده می‌شد تا غلظت‌های صفر، ۱۵۰، ۳۰۰، ٤٥٠ و ٦٠٠ میلی گرم در لیتر به‌دست بیاید. این سطوح در زمان انجام آزمون تولید گاز به سرنگ‌های تولید گاز افزوده شدند (طالب‌زاده و همکاران، ۲۰۱۲).

مایع شکمبه: مایع شکمبه از چهار راس گوسفند نر فیستولا دار (نژاد مهربان)، از بخش‌های مختلف شکمبه و قبل از وعده تغذیه صبح‌گاهی جمع‌آوری شد. ذرات درشت مایع شکمبه با عبور دادن از چهار لایه پارچه متقال جدا شده و برای اطمینان از وجود شرایط بی‌هوازی تا شروع آزمایش تولید گاز

1- Gas Chromatography- Mass Spectroscopy

از جریان گاز دی‌اکسید کربن بر روی مایع شکمبه صاف شده استفاده گردید و در یک بن ماری با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

کینتیک تولید گاز: آزمون تولید گاز براساس روش منک و استینگاس (۱۹۸۸) انجام شد. سوبسترای مورد استفاده برای آزمون تولید گاز نمونه‌ای از یک جیره مورد استفاده برای گوسفندان پرواری بود. جیره‌ی مورد استفاده بر اساس ماده خشک شامل ۱۷٪ علوفه خشک یونجه، ۱۲٪ کاه گندم، ٦۱٪ دانه جو، ۹٪ کنجاله سویا و ۱٪ پرمیکس ویتامین و مواد معدنی بود. نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از آسیاب دارای غربال یک میلی‌متری (آاگ، آمریکا)آسیاب شدند. در داخل سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی لیتری (هابرله–فورتون، آلمان) مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا و ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه–بافر ریخته شد. بافر مورد استفاده بر اساس توصیه منک و استینگاس تهیه شد. سرنگ‌ها در داخل بن ماری (با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند و در ساعت‌های ۱، ٤، ۷، ۱۰، ۱۳، ۱٦، ۱۹/۵، ۲۳، ۲٦، ۲۹، ۳٦،۳۲، ٤۰، ٤۵، ۵۰، ۵۵، ٦۱، ٦۹/۵، ۸۰، ۹٦، ۱۲۰ و ۱٤٤ ساعت مقدار گاز تولیدی یادداشت گردید. در پایان انکوباسیون محتویات سرنگ‌ها از بوته‌های شیشه‌ای گوچ (شماره یک، قطر منافذ ۱۰۰ میکرون) عبور داده شد تا مواد جامد از مایع جدا شود. پس از چندین بار شستشوی ذرات جامد باقی‌مانده با آب داغ، بوته‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند تا ماده خشک بالقوه تجزیه‌پذیر[1] (D_{144}) برآورد شود. داده‌های تولید گاز بر اساس مدل تعمیم یافته میشرلیخ برازش شدند (فرانس و همکاران، ۲۰۰۰):

$$GP = A\left\{1 - e^{-[b(t-L)+c(\sqrt{t}-\sqrt{L})]}\right\}$$

در این معادله GP مقدار گاز تولیدی به صورت تجمعی در زمان t (میلی‌لیتر به ازای گرم ماده‌ی آلی)، A مقدار بالقوه گاز تولیدی (میلی‌لیتر به ازای گرم ماده‌ی آلی) یا نقطه‌ی مجانب منحنی تولیدی گاز، b (در ساعت یا h/)و c (در ساعت به توان نیم یا $h^{0.5}$/) ضرائب و L فاز تاخیر (ساعت) بود. فراسنجه‌های مذکور برای هر سرنگ با استفاده از نرم افزار گرافپد پریسم ورژن ۵/۰٤ برآورد شد. با استفاده از رابطه‌های زیر زمانی (ساعت) که گاز به نصف حداکثر مقدار تولیدی می‌رسد ($T_{1/2}$) و سرعت نسبی تجزیه سوبسترا (μ) در زمان $T_{1/2}$ (واحد: در ساعت یا h^{-1}) محاسبه گردید:

1- Potentially degradable dry matter

$$T_{\frac{1}{2}} = \left[\left(-\frac{c}{2} + \sqrt{\left\{\frac{c^2}{4} + b\left[bL + c\sqrt{L} - \ln(0.5)\right]\right\}}\right)/b\right]^2$$

$$\mu = b + c/\left(\sqrt{T_{\frac{1}{2}}}\right).$$

مقدار تجزیه پذیری ماده خشک سوبسترا در شکمبه (E) با استفاده از روابط زیر برآورد گردید (فرانس و همکاران، ۲۰۰۰):

$$E = D_{144}I$$

و برای محاسبه I از رابطه زیر و حل عددی با روش ذوزنقه در نرم افزار اکسل ۲۰۰۷ استفاده شد:

$$I = \int_{L}^{\infty} [b + c/(2\sqrt{L})]e^{-[(b+k)(t-L)+c(\sqrt{t}-\sqrt{L})+kL]}dt.$$

در این رابطه k نرخ عبور بوده و به‌طور فرضی ۰/۰۳۵ در ساعت در نظر گرفته شد.

غلظت آمونیاک، قابلیت هضم آزمایشگاهی ماده‌ی آلی،کل اسیدهای چرب فرار: آزمون تولید گاز به مدت ۲٤ ساعت انجام شد. پس از ۲٤ ساعت حجم گاز تولیدی اندازه گیری شد و سپس محتویات سرنگ‌ها به داخل لوله‌های فالکون منتقل و به مدت ٤٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۵۰۰۰ ×g سانتریفوژ شدند. مایع رویی با دقت جداسازی و تا انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. لوله‌های فالکون حاوی بقایای هضم نشده به‌مدت ٤۸ ساعت در درمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند. پس از ثبت وزن بقایای خشک شده، محتویات لوله‌ها به کیسه‌های پلی استری منتقل شده و به مدت ۱ ساعت در محلول شوینده خنثی جوشانده شدند. کیسه در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک و وزن آن‌ها ثبت شد. محتویات کیسه‌ها به بوته‌های چینی منتقل و در دمای ٦۰۰ درجه سانتی‌گراد خاکستر شدند. با کسر مقدار خاکستر به دست آمده از وزن ماده‌ی داخل کیسه مقدار قابلیت هضم حقیقی ماده آلی محاسبه شد. نسبت ماده آلی هضم شده حقیقی (میلی‌گرم) به حجم گاز تولیدی (میلی‌لیتر) به‌عنوان ضریب تفکیک (PF) در نظر گرفته شد (بلومل و همکاران، ۱۹۹۷). تفاوت وزن نمونه‌های موجود در کیسه قبل و بعد از جوشاندن در محلول شوینده خنثی به‌عنوان تخمین کلی از توده میکروبی در نظر گرفته شد (مکار، ۲۰۱۰).

غلظت آمونیاک موجود در مایع رویی با استفاده از روش فنل-هیپوکلریت اندازه‌گیری شد (برودریک و کانگ، ۱۹۸۰). غلظت کل اسیدهای چرب نیز با استفاده از تقطیر در بخار به وسیله دستگاه مارخام اندازه گیری شد (بارنت و رید، ۱۹۵۷).

جدول ۱- ترکیب اسانس روغنی زنیان (*Carumcopticum*).

ترکیب	شاخص بازداری*	درصد
آلفا-توجن	۹۳۱/۷٦	۰/۳۲
آلفا-پاینن	۹٤۱/۱۸	۰/۱۱
سابینن	۹۷۹/۱٦	۰/۱۹
بتا-پاینن	۹۸٦/۲۷	۰/٤۲
مایرسن	۹۹۰/۵۹	۰/۵۱
آلفا-ترپینن	۱۰۲۲/۲	۰/۰۲
پارا-سایمن	۱۰۳۰/۳	۲۲/۹
۱ و ۸- سینئول	۱۰۳۸/٤	۰/۵
اوسیمن	۱۰٤۷/۲	۰/۰٤
گاما-ترپینن	۱۰٦٤/۸	۲۳/۹۲
سیس- سابینن هیدرات	۱۰۷۲/۲	۰/۰٤
لینالول	۱۰۹۸/٦	۰/۰۱
ترانس-سابینن هیدرات	۱۱۰۵/٦	۰/۰۳
سیکلوسیترال	۱۱۷۱/۹	۰/۱۳
ترپینن-٤-أل	۱۱۸۵/۳	۰/۱۱
آلفا-ترپینئول	۱۱۹۸/۹	۰/۰۹
تیمول	۱۲۹۵	۵۰/۰۷
کارواکرول	۱۳۰۱/٤	۰/۱۳
جمع		۹۹/۵٤

* شاخص‌های بازداری کواتس با استفاده از ستون کاپیلاری DB-5 تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها با ٤ تکرار انجام شد. داده‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از مدل خطی عمومی (GLM) در نرم‌افزار SAS (۸/۱) سال ۲۰۰۰ آنالیز شدند. مدل آماری مورد استفاده به‌صورت زیر بود:

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

در این مدل Y_{ij} مشاهده، μ: میانگین هر فراسنجه، D_i اثر سطح اسانس و e_{ij} خطای آزمایش می‌باشد. برای بررسی اثرات اسانس از آنالیز چند جمله‌ای اورتوگونال استفاده شده و نوع اثرگذاری به‌صورت خطی (L) یا درجه دو (Q) تعیین گردیدند.

نتایج

بر اساس داده‌های موجود مشخص شد که تیمول (۵۰/۰۷ درصد)، گاما- ترپینن (۲۳/۹۲ درصد) و پارا-سایمن (۲۲/۹۰ درصد) اجزاء تشکیل دهنده اصلی اسانس زنیان هستند (جدول ۱). در ارتباط با فراسنجه‌های برآورد شده تیمار شاهد یا بدون اسانس دارای بیشترین مقادیر ثبت شده برای حداکثر مقدار تولید گاز (A)، سرعت تخمیر (μ)، ناپدید شدن ماده خشک پس از ۱۴۴ ساعت (D_{144}) و تجزیه پذیری ماده خشک (E) بود. کمترین مقدار $T_{1/2}$ در سطح ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. با افزایش مقدار اسانس از ۴۵۰ به ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر زمان فاز تاخیر افزایش چشمگیری نسبت به سایر تیمارها داشت.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف اسانس روغنی زنیان بر فراسنجه‌های برآورد شده در آزمون تولید گاز

فراسنجه	دوزهای مورد استفاده (میلی‌گرم در لیتر)					خطای	مقایسه و نوع اثر		
	۰	۱۵۰	۳۰۰	۴۵۰	۶۰۰	معیار بین میانگین‌ها	شاهد و سایرتیمارها	خطی	درجه دوم
A	۴۳۰/۹	۴۰۴/۷	۳۸۷/۸	۲۳۰/۳	۱۴۷/۹	۶/۵۲	***	***	***
L	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۱۴	۰/۰۸	۱/۷۸	۰/۰۸	***	***	***
$T_{1/2}$	۷/۸۴	۸/۲۷	۱۴/۱	۱۰/۹	۶/۶	۰/۹۴	***	ns	***
μ	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۰۲	***	***	***
D_{144}	۰/۴۷	۰/۴۶	۰/۴۲	۰/۴۱	۰/۲۷	۰/۰۰۵	***	***	***
E	۰/۶۵	۰/۶۰	۰/۴۶	۰/۴۸	۰/۴۶	۰/۰۰۹	***	ns	ns

A: حداکثر مقدار تولید گاز یا نقطه مجانب منحنی (میلی‌لیتر به ازای گرم ماده‌ی آلی)،L: فاز تاخیر (ساعت)، $T_{1/2}$: زمانی که نصف مقدار حداکثر تولید گاز تولید می‌شود (ساعت)، μ: نرخ تولید گاز در زمان $T_{1/2}$ (h^{-1})، D_{144}: نسبت ماده‌ی خشک ناپدید شده پس از ۱۴۴ ساعت انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی، E: مقدار تجزیه پذیری برآورد شده در شکمبه، SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، ***: $P<0/001$، ns: تفاوت معنی‌دار نیست.

به استثنای آمونیاک، شاخص‌های تولید گاز پس از ۲٤ ساعت، کل اسید چرب و قابلیت هضم حقیقی ماده‌ی آلی بین تیمار شاهد و سایر تیمارها معنی دار بود. با افزایش سطوح اسانس زنیان مقدار گاز تولید کاهش یافت (خطی و درجه دوم، P<۰/۰۰۱). مقدار توده میکروبی صورت خطی (P<۰/۰۰۱) و درجه دو (P<۰/۰۱) تحت تاثیر قرار گرفت. بیشترین مقدار توده میکروبی در سطح ۳۰۰ پی‌پی‌ام و کمترین آن در سطح ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر دیده شد. همچنین سطوح مختلف اسانس بر ضریب تفکیک معنی دار بود (خطی و درجه دوم، P<۰/۰۰۱). ضریب تفکیک نیز به موازات افزایش غلظت اسانس قابلیت هضم ماده‌ی آلی کاهش یافت. مقدار این فراسنجه در تیمار شاهد ۸۰/۰۲ درصد و در سطح ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر ٦۷/۷۱ درصد بود.

جدول ۳- اثر سطوح مختلف اسانس روغنی زنیان بر فراسنجه‌های تخمیر و قابلیت هضم

فراسنجه	دوزهای مورد استفاده (میلی‌گرم در لیتر)					خطای	مقایسه و نوع اثر		
	۰	۱۵۰	۳۰۰	٤۵۰	٦۰۰	معیار بین میانگین‌ها	شاهد و سایرتیمارها	خطی	درجه دوم
تولید گاز پس از ۲٤ ساعت (میلی‌لیتر به ازای گرم ماده‌ی آلی)	۱۵۲/٤۷	۱٤٦/۷	۱٤۰/٤	۱۲۳/۲	۵۵/٦	۱/٤۲	***	***	***
کل اسیدهای چرب (میلی‌مول بر لیتر)	۵۷/٤	۵۰/۸	٤٤/۲	۳۷/۵	۱۰/۸	۳/۸	***	***	*
آمونیاک (میلی‌مول بر لیتر)	۲۳/۱	۲۳/۱	۲۱/۹	۲۵/۹	۲۲/۳	۱/۱۳	ns	ns	ns
توده میکروبی (میلی‌گرم)	۱۲٤/۷	۱٤۰/۳	۱۵۵	۱۳۳/۷	٤۲/۳	۱۳/۲٦	***	**	***
ضریب تفکیک	۲/٤٦	۲/۵	۲/۵	۲/۸	۵/۷	۰/۱۲	***	***	***
قابلیت هضم حقیقی ماده‌ی آلی (درصد)	۸۰/۰۲	۷۸/٦۲	۷۵/۰۵	٦۸/٦۱	٦۷/۷۱	۱/۳۰	**	***	ns

SEM *: P<۰/۰۵، **: P<۰/۰۱، ***: P<۰/۰۰۱، ns: تفاوت معنی‌دار نیست

بحث

در حالی‌که در این آزمایش تیمول یکی از اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس زنیان بود، گودرزی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند تیمول (۳٦/۷ درصد) و گاما-ترپینن (۳٦/۵ درصد) ترکیب اصلی تشکیل‌دهنده این اسانس بودند. به نظر می‌رسد عواملی مانند زمان برداشت و شرایط محیطی و فصلی بر ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس اثر می‌گذارد (دافررا و همکاران، ۲۰۰۰).

افزودن اسانس زنیان به سرنگ‌های تولید گاز، مقدار گاز تولیدی را کاهش داد. مشابه با نتایج این تحقیق مچبوف و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده نمودند افزودن اسانس مرزنجوش (*Origanum vulgar* L.) تا ۸۳ درصد تولید گاز را کاهش داد. افزایش فاز تاخیر می‌تواند به این دلیل باشد که می‌بایست جمعیت میکروبی تکثیر یافته و برروی ذرات خوراک و برای تشکیل بیوفیلم کلونی تشکیل دهند (دهوریتی، ۲۰۰۳). با توجه به این‌که تیمول ساختار فنولی دارد احتمالاً در سطوح بالای اسانس این ترکیبات همانند تانن‌ها عمل می‌کنند (طالب‌زاده و همکاران، ۲۰۱۲). مشخص شده است که تانن‌ها هضم بخش قابل حلخوراک (آهارونی و همکاران، ۱۹۹۸) و اتصال باکتری‌ها به ترکیبات غیر قابل حل خوراک را مهار می‌کنند (مک آلیستر و همکاران، ۱۹۹٤). همچنین در یک آزمایش مشابه طالب‌زاده و همکاران (۲۰۱۲) از اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) برای تغییر الگوی تخمیر استفاده نمودند. با اینکه سطوح مورد استفاده و سوبسترای تخمیر شبیه این آزمایش بود، اما الگوی تخمیر متفاوت بود. مقدار گزارش شده برای فراسنجه‌های فاز تاخیر و $T_{1/2}$ برای سطوح ٤۵۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشتر از مقادیر به‌دست آمده در پژوهش حاضر بود. علت این اختلاف می‌تواند به‌دلیل تفاوت در اجزای تشکیل دهنده اسانس باشد. اسانس آویشن شیرازی عمدتاً از کارواکرول و تا حد کمتری از تیمول تشکیل شده است. به نظر می‌رسد وجود کارواکرول به همراه تیمول اثرات ضد میکروبی اسانس را تشدید می‌کند (یوتلی و همکاران، ۲۰۰۲).

با اینکه مقدار گاز تولیدی در اثر افزودن اسانس کاهش یافت اما توده میکروبی افزایش یافت. این پدیده می‌تواند به این دلیل باشد که ماده‌ی آلی تجزیه شده به جای اینکه به سمت تولید اسید چرب و گاز برود، بیشتر باعث تولید توده میکروبی شده است. یکی از راه‌های دستکاری تخمیر شکمبه تغییر در متابولیسم مواد مغذی توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه است. به‌طوری نسبی اگر تبدیل ماده‌ی آلی هضم شده به توده میکروبی در مقایسه با تولید گاز (اسیدهای چرب) بیشتر باشد، بازدهی استفاده از کربن و نیتروژن افزایش می‌یابد (مکار،۲۰۱۰). در یک آزمایش (*In vitro*) افزودن اسانس نعناع اخضر

به سرنگ‌های تولید گاز، در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر توده میکروبی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (تقوی‌نژاد و همکاران، ۲۰۱۱).در ارتباط با تولید آمونیاک، مشابه با نتایج این پژوهش بنچار و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده نمودند که افزودن ٤۰۰ میلی‌گرم در لیتر کارواکرول (با خلوص بیش از ۹۸ درصد) و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تیمول (خلوص بیش از ۹۹ درصد) با استفاده کشت آزمایشگاهی[1] تاثیری بر تولید آمونیاک نداشت. اثر اسانس‌ها در آزمایش‌های مختلف بر غلظت آمونیاک متفاوت است. در تعدادی از پژوهش‌ها افزودن اسانس باعث کاهش (مچبوف و همکاران، ۲۰۰۸) و یا افزایش (پاترا و ساکسنا،۲۰۰۹) غلظت آمونیاک شده‌اند. علت این تفاوت‌ها احتمالاً مربوط به نوع اسانس و سوبسترای مورد استفاده می‌باشد. افزودن اسانس زنیان در سطح ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش غیر متعارفی در مقدار ضریب تفکیک شد (٥/٦٧). مقدار طبیعی این فراسنجه ۲/۷٥ تا ٤/٤۱ می‌باشد (بلومل و همکاران، ۱۹۹۷). از سوی دیگر مقدار توده میکروبی در سطح ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر کمتر از سایر تیمارها بود. هر اندازه مقدار ضریب تفکیک بالا باشد نشان دهنده‌ی اینست که ماده‌ی آلی تجزیه شده بیشتر به سمت تولید توده‌ی میکروبی رفته تا تولید اسیدهای چرب فرار (بلومل و همکاران، ۱۹۹۷). بالا بودن ضریب تفکیک و کم بودن توده‌ی میکروبی در سطح ٦۰۰ میلی گرم در لیتر احتمالاً به این دلیل است که سوبسترای تخمیری تا حدی حل شده است، بدون اینکه مورد استفاده میکروارگانیسم‌ها قرار گرفته و تبدیل به اسید چرب بشود. به‌عبارت دیگر اسانس باعث شده است تا میکروارگانیسم‌ها تا حدی نتوانند از ماده‌ی آلی حل شده به عنوان منبع انرژی استفاده کنند. بالاتر بودن بیش از حد ضریب تفکیک گاهی اوقات در خوراک‌های حاوی تانن و خوراک‌های سیلو شده مشاهده می‌شود (مکار، ۲۰۰٤).

افزودن اسانس به‌ویژه در سطوح بالا باعث کاهش قابلیت هضم ماده‌ی آلی شد. با توجه به اینکه ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول در سطوح بالا اثرات ضد میکروبی غیر اختصاصی دارند (علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کنند، فریزر و همکاران، ۲۰۰۷)، احتمالاً باعث کاهش فعالیت گروه‌هایی از باکتری‌ها شده‌اند که در هضم خوراک دخیل هستند. در صورتی که چنین نتیجه‌ای به شرایط عملی تغذیه نشخوارکنندگان تعمیم داده شود، به‌دلیل کاهش هضم ماده آلی باعث کاهش عملکرد دام می‌شود.

1. *In vitro* batch culture

با توجه به تنوع اجزا تشکیل دهنده نمی‌توان خصوصیات ضد میکروبی را به یکی از اجزای تشکیل دهنده ارتباط داد. علاوه بر تیمول، گاما ترپینین و پارا–سایمن نیز به مقدار بیشتری نسبت به سایر اجزا مشاهده شد. این ترکیبات توانایی مهار رشد گروه‌های خاصی از باکتری‌ها را دارند (رامان و همکاران، ۱۹۹۵؛ جیروووتز و همکاران، ۲۰۰۶؛ سنبلی و همکاران، ۲۰۰۵).

به‌طور کلی با توجه به نتایج به‌دست آمده از تولید گاز می‌توان دریافت که اسانس زنیان دارای فعالیت بازدارنده علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌های شکمبه (دخیل در تخمیر مواد آلی و بالطبع تولید گاز) است. اگرچه افزودن اسانس زنیان قابلیت هضم ماده‌ی آلی را کاهش داد اما در سطوح میانی (۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تولید توده میکروبی افزایش یافت که نشان دهنده‌ی توانایی بالقوه این اسانس برای دستکاری تخمیر در شکمبه است. پیشنهاد می‌گردد اثرات این اسانس در سطوح پایین‌تر و در ترکیب با سایر اسانس‌ها و ترکیبات گیاهی برای تولید پروتئین میکروبی و تولید اسیدهای چرب فرار بررسی گردد.

منابع

1. Adams, R.P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed. Allured Publishing Corporation, IL, USA.
2. Agarwal, N., Shekar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C., and Kamra, D.N. 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. Anim. Feed Sci. Technol.148: 321-327.
3. Aharoni, Y., Gilboa, N., and Silanikove, N. 1998: Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. Anim Feed Sci.Technol71:251-267.
4. Arora, D.S., and Kaur, G.J. 2007. Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. J. Nat. Med. 61: 313–317.
5. Barnett, A.J.G., and Reid, B.L. 1957. Studies on the production of fatty acids from the rumen liquor in an artificial rumen. I. The volatile fatty acid production from grass. J. Agri. Sci. 48: 315–321.
6. Benchaar, C., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Wang, Y., Beauchemin, K.A., and McAllister, T.A. 2007. Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. Can. J. Anim. Sci.87: 413–419.
7. Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., and Beauchemin, K.A. 2008a. A review of plant-derived

essential oils in ruminant nutrition and production. Anim. Feed Sci. Technol. 145: 209–228.
8. Benchaar, C., McAllister, T.A., and Chouinard, P.Y. 2008b. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. J. Dairy Sci. 91:4765–4777.
9. Blümmel, M., Makkar, H.P.S., and Becker, K. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.77: 24–34.
10. Broderick, G.A., and Kang, J.H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. J. Dairy Sci. 63: 64–75.
11. Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., and Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90:2580–2595
12. Daferera, D.J., Ziogas, B.N., and Polissiou, M.G. 2000. GC-MS analysis of essential oils from Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillum digitatum*. J. Agric. Food Chem.48: 2576–2581.
13. Dalkani, M., Darvishzadeh, R., and Hassani, A. 2011. Correlation and sequential path analysis in Ajowan (*Carum copticum*L.). J. Med. Plants Res.5: 211-216.
14. France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., Lopez, S., and Bannink, A. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profile observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. Br. J. Nutr.83: 143-150.
15. Fraser, G.R., Chaves, A.V., Wang, Y., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., and Benchaar, C. 2007. Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. J. Dairy Sci. 90:2315–2328
16. Goudarzi, G.R., Saharkhiz, M.J., Sattari, M., and Zomorodian, K. 2011. Antibacterial activity and chemical composition of ajowan (*Carumcopticum* Benth. & Hook) essential oil. J. Agric. Sci. Technol. (Tehran, Islamic Repub. Iran).13: 203-208.
17. Hobson, P.N., and Stewart, C.S. 1997. The Rumen Microbial Ecosystem. Pp. 140–195. Blackie Academics and Professional, Suffolk, UK,
18. Jirovetz, L.,Bail, S.,Buchbauer, G., Denkova, Z., Slavchev, A., Stoyanova, A., Schmidt, E., and Geissler, M. 2006. Antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and olfactory evaluation of an essential oil of hop cones (*Humulus lupulus* L.) from Bavaria and some of its main compounds. Sci. Pharm.74:189–201.

19. Macheboeuf, D., Morgavi, D.P., Papon, Y., Mousset, J., and Arturo-Schann, M. 2008. Dose-responces effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. Anim. Feed Sci. Technol.145: 335-350.
20. Makkar, H.P.S. 2004. Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. Assessing Quality and Safety of Animal Feeds. FAO Animal Production and Health Series 160. FAO, Rome, pp. 55–88.
21. Makkar, H.P.S. 2010. In vitro screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S. and Schlink, A.C. (eds.) In vitro Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: pp. 107-144. Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, the Netherlands.
22. McAlister, T.A., Bae, H.D., Jones, J.A., and Cheng, K.J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim Sci. 72: 3004-3018.
23. Menke, K.H., and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim Res. Develop. 28: 7–55.
24. Patra, A.K., and Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial population. Antonie Van Leeuwenhoek. 96: 363-375.
25. Official Journal European Union. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the council of 22 September on additives for use in animal nutrition. L268/36.
26. Raman, A., Weir, U., and Bloomfield, S.F. 1995. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. Epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. Lett. Appl. Microbiol.21:242– 245.
27. Sonboli, A., Eftekhar, F., Yousefzadi, M., and Kanani, M.R. 2005. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. From Iran. Zeitschriftfür Naturforschung. C 60: 30-34.
28. Taghavi-Nezhad, M., Alipour, D., Torabi Goudarzi, M., Zamani, P., and Khodakaramian G. 2011. Dose response to carvone rich essential oils of spearmint (*Mentha spicata*): *in vitro* ruminal fermentation kinetics and digestibility. J. Agric. Sci. Technol. (Tehran, Islamic Repub. Iran).13: 1013-1020.
29. Talebzadeh, R., Alipour, D., Saharkhiz, M.J., Azarfar, A., and Malecky, M. 2012. Effect of essential oils of *Zataria multiflora*on *in vitro* rumen fermentation, protozoal population, growth and enzyme activity of anaerobic fungus isolated from Mehraban sheep. Anim. Feed Sci. Technol.172: 115-124.
30. Ultee, A.,Bennik, M., and Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol.68:1561– 1568.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 1 (3), 2013
http://ejrr.gau.ac.ir

In vitro evaluation of the effects of Ajowan (*Carumcopticum*L.) essential oils on the parameters of ruminal fermentation

R. Talebzadeh[1], [*]D. Alipour[2], M.J. Saharkhiz[3] and M. Malecky[2]
[1]M.Sc. Graduated, [2]Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University of Hamedan, [3]Associate Prof., Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shiraz University
Received: 12/07/2012; Accepted: 06/10/2013

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of Ajowan essential oils (AEO) on rumen fermentation using *in vitro* gas production. Therefore, different doses of AEO (i.e., 0, 150, 300, 450 or 600 ppm) were added to the syringes of the gas production. A typical diet of growing lambs was used as fermentation substrate. At the first step, the gas production syringes were incubated for 144 hours to estimate kinetics of fermentation (i.e., asymptotic gas production, lag time and extent of dry matter degradation). At the second phase, concentration of total volatile fatty acids (TVFA), ammonia, microbial mass and true organic matter digestibility were determined. Inclusion of AEO decreased asymptotic gas production and extent of dry matter degradability. Using AEO at levels of 150 or 300 ppm enhanced microbial mass. Partitioning factor also increased in parallel with the increment of AEO level, whereas true organic matter digestibility declined. Overall, the result of this study showed the antimicrobial activity of AEO against rumen microorganisms. AEO has the potential for modulating rumen fermentation and further research is needed to assess its effect upon microbial biomass and profile of individual fatty acids at lower doses of inclusion.

Keywords: Ajowan; Rumen fermentation; *in vitro* gas production; Microbial mass

[*]Correspondin Author; Email: alipourd@basu.ac.ir