Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Effects of different levels of the savory essential oil on *in vitro* ruminal fermentation parameters, microbial protein synthesis, and protozoal populations in two diets supplemented with fish and soybean oil

Mostafa Mehdipour Golbotteh[1], Mostafa Malecky[2*], Hasan Aliarabi[3], Pouya Zamani[3]

[1] PhD student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
[2] Associate Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, Email: mmalecky@basu.ac.ir
[3] Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 04/19/2022
Revised: 06/19/2022
Accepted: 06/20/2022

Keywords:
Microbial protein
Protozoa
Rumen fermentation
Essential oil
Satureja khuzistanica

ABSTRACT

Background and objectives: Despite the central importance of ruminants in providing human nutritional requirements, their relatively low production efficiency often leads to increased production costs and pollutes the environment. In this connection, using supplements and feed additives have been considered efficient strategies for improving the efficiency of livestock production. The plant-based feed additives, including essential oils and plant extracts, are the products that improve the efficiency of ruminant production by ameliorating the rumen digestion and fermentation. On the other hand, using the supplements, such as different fat sources as the energetic supplement in animal diets has had several positive impacts such as reducing ruminal acidosis, reducing methane production and consequently declining environmental pollution, and improving feed energy efficiency and the performance of animals. Regarding the growing importance of high-quality products and special interest of consumers for the safety and quality of animal products in recent years, the feed additives of natural and green origin have been of great interest for animal nutritionists in recent decades. In this context, the current research aimed at investigating *in vitro* the savory essential oil effects on rumen fermentation, microbial protein synthesis, and protozoal population in two diets supplemented with fish and soybean oils.

Materials and methods: The essential oil was extracted by steam distillation using a Clevenger apparatus, and subsequently analyzed qualitatively and quantitatively by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The effects of essential oil on fermentation parameters were tested in vitro at 0, 150, 300, 450, and 600 mg/L in two diets supplemented with fish and soybean oils incubated for 24 hours.

Results: None of the rumen fermentation parameters was affected by the diet type. The gas produced over 24 h of incubation, in vitro true dry matter and organic matter degradability decreased linearly with increasing doses of the essential oil ($P<0.01$) in both experimental diets. However, the partitioning factor as well as the microbial protein, and the efficiency of microbial protein synthesis increased none-linearly (linearly and quadratically) and linearly, respectively, with the essential oil dosage ($P< 0.01$). The ruminal ammonia concentration decreased none-linearly with the essential oil dosage ($P<0.01$). Total protozoa numbers as well as most of the rumen common protozoal genera were reduced by increasing doses of the essential oil ($P<0.01$). Total concentration of volatile fatty acids

(VFA) increased at the doses up to 450 and 300 mg/L of the essential oil in the fish oil and soybean oil containing diets, respectively (P<0.05), and decreased thereafter at higher doses. The acetate molar proportions decreased none-linearly and that of propionate increased quadratically in both diets with essential oil dosage (P< 0.05).

Conclusion: Generally, the findings indicated that using the savory essential oil, especially at low and medium doses, improved rumen fermentation through enhancing microbial protein synthesis, reducing ammonia and protozoa population, and increasing TVFA. Hence, the above-mentioned doses of this essential oil can improve rumen fermentation thereby enhancing the farm animals' productivity. However, the savory essential oil seems to have a negative impact on some rumen microorganisms at 450 mg/L and higher doses.

Cite this article: Mehdipour Golbotteh, M., Malecky, M., Aliarabi, H., Zamani, P. (2022). Effects of different levels of the savory essential oil on in vitro ruminal fermentation parameters, microbial protein synthesis and protozoal populations in two diets supplemented with fish and soybean oil. *Journal of Ruminant Research*, 10 (3), 87-110.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/EJRR.2022.20101.1845
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، سنتز پروتئین میکروبی و جمعیت پروتوزوآ در دو جیره‌ی حاوی روغن سویا و ماهی در شرایط آزمایشگاهی

مصطفی مهدی پورگل بته[1]، مصطفی ملکی[2*]، حسن علی‌عربی[3]، پویا زمانی[3]

[1] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران
[2] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، رایانامه: mmalecky@basu.ac.ir
[3] استاد گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۳۰
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۳/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۳۰

واژه‌های کلیدی:
پروتئین میکروبی
پروتوزوآ
تخمیر شکمبه
روغن اسانسی
مرزه خوزستانی

چکیده

سابقه و هدف: باوجود اهمیت استراتژیک نشخوارکنندگان در تأمین نیازهای غذایی انسان، کارایی تولید نسبت پایین آن‌ها اغلب منجر به افزایش هزینه‌های تولید و ایجاد آلودگی‌های زیست‌محیطی می‌گردد. در این راستا، استفاده از مکمل‌ها و افزودنی‌های خوراکی از جمله راهکارهای مؤثر در جهت بهبود کارایی عملکرد تولید دام‌ها است. افزودنی‌های خوراکی با منشأ گیاهی همچون روغن‌های اسانسی و عصاره‌ها از جمله ترکیباتی هستند که موجب بهبود کارایی تولید نشخوارکنندگان، به‌واسطه بهبود عملکرد هضم و تخمیر شکمبه می‌گردند. از طرف دیگر، استفاده از منابع مختلف چربی به‌عنوان مکمل انرژتیک در جیره دام‌ها، اثرات مثبتی همچون افزایش عملکرد، کاهش اسیدوز شکمبه، کاهش تولید متان و به تبع آن کاهش آلودگی زیست‌محیطی و بهبود بهره‌وری انرژی خوراک را به دنبال داشته است. با توجه به اهمیت روزافزون کیفیت محصولات تولیدی و توجه ویژه مصرف‌کنندگان به شاخص‌های سلامتی و کیفیت فرآورده‌های دامی در دهه‌های اخیر، افزودنی‌های با منشأ طبیعی و سبز در دهه‌های اخیر موردتوجه محققین تغذیه دام قرار گرفت. در این راستا، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات روغن اسانسی مرزه خوزستانی بر شاخص‌های تخمیر شکمبه، سنتز پروتئین میکروبی و جمعیت پروتوزآی شکمبه در دو جیره حاوی روغن ماهی و سویا بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق روغن اسانسی مرزه خوزستانی به روش تقطیر با بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج گردید و ترکیب شیمیایی آن با استفاده از گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف سنج جرمی تعیین شد. در این آزمایش، روغن اسانسی مرزه خوزستانی در دوزهای ۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در دو جیره حاوی روغن ماهی و سویا در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از انکوباسیون ۲۴ ساعته به‌منظور بررسی اثرات آن بر شاخص‌های تخمیر شکمبه‌ای مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته‌ها: هیچ‌کدام از فراسنجه‌های تخمیر تحت تأثیر نوع جیره قرار نگرفت. حجم گاز تولیدشده بعد از ۲۴ ساعت، میزان تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی ماده خشک و ماده آلی با افزایش دوز اسانس در هر دو جیره به‌طور خطی کاهش یافت ($P<0/01$). بااین‌حال، فاکتور تفکیک و پروتئین میکروبی، با افزایش دوز اسانس به‌طور غیرخطی (خطی و درجه دو) و کارایی سنتز پروتئین میکروبی به‌صورت خطی افزایش

یافت (P<۰/۰۱). همچنین، غلظت آمونیاک شکمبه‌ای به‌موازات افزایش دوز اسانس، به‌صورت غیرخطی کاهش یافت (P<۰/۰۱). تعداد کل پروتوزوآ و همچنین جمعیت اغلب جنس‌ها در هر دو جیره با افزایش دوز اسانس کاهش یافت (P<۰/۰۵). غلظت کل اسیدهای چرب فرار در جیره حاوی روغن ماهی تا سطح ٤٥٠ میلی‌گرم بر لیتر و در جیره حاوی روغن سویا تا سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس افزایش و بعد از آن کاهش یافت (P<۰/۰۵). در هر دو جیره، به‌موازات افزایش دوز اسانس نسبت غلظت استات به‌صورت غیرخطی کاهش و نسبت پروپیونات به‌صورت تابع درجه دو افزایش یافت (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: در مجموع، این یافته‌ها نشان داد که استفاده از روغن اسانسی مرزه به‌خصوص در دوزهای پایین و متوسط به‌واسطه بهبود سنتز پروتئین میکروبی، کاهش آمونیاک و جمعیت پروتوزوآیی و همین‌طور افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار، موجب بهبود تخمیر شکمبه گردید. لذا استفاده از سطوح مذکور این روغن اسانسی در جیره دام‌ها می‌تواند ضمن بهبود کارایی تخمیر شکمبه موجب ارتقاء سطح تولید دام‌ها گردد. با این حال، به نظر می‌رسد دوزهای ٤٥٠ میلی‌گرم بر لیتر و بالاتر روغن اسانسی مرزه دارای اثرات منفی بر برخی از جمعیت‌های میکروبی باشد.

استناد: پورگل بته، م.م.، ملکی، م.، علی‌عربی، ح.، زمانی، پ. (١٤٠١). اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، سنتز پروتئین میکروبی و جمعیت پروتوزوآ در دو جیره حاوی روغن سویا و ماهی در شرایط آزمایشگاهی. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۰ (۳)، ۱۱۰-۸۷.

DOI: 10.22069/EJRR.2022.20101.1845

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

نظر به رشد روزافزون جمعیت در بسیاری از کشورهای دنیا و به‌تبع آن افزایش نیازهای غذایی جوامع انسانی و همچنین نقش دام‌ها از جمله نشخوارکنندگان در تأمین نیازهای غذایی به‌خصوص نیازهای پروتئینی آن‌ها، لزوم توجه ویژه به افزایش تولید در این دام‌ها را دوچندان کرده است (Minson، ۱۹۹۷). بااین‌حال، محدودیت در تأمین نهاده‌ها به دلیل تخریب منابع طبیعی و خشک‌سالی‌ها، امکان افزایش تولید در بخش دام‌پروری را با چالش مواجه نموده و لذا افزایش بهره‌وری تولید به‌عنوان تنها راهکار افزایش پایدار تولید در این بخش مطرح است. در این راستا، استفاده از مکمل‌ها و افزودنی‌های خوراکی ازجمله راهکارهای مؤثر برای بهبود کارایی تولید دام‌ها است (Honan و همکاران، ۲۰۲۱). استفاده از منابع مختلف چربی به‌عنوان مکمل انرژتیک در مقادیر توصیه‌شده (حداکثر حدود ۵ درصد) در جیره دام‌ها، اثرات مثبتی همچون تأمین مناسب نیازهای انرژی در دام‌های پر تولید و افزایش عملکرد تولید شیر (AbuGhazaleh همکاران، ۲۰۰۲؛ Donovan و همکاران، ۲۰۰۰؛ Alizadeh و همکاران، ۲۰۱۲)، کاهش اسیدوز شکمبه، بهبود جذب مواد مغذی محلول در چربی، کاهش تولید متان و آلودگی زیست‌محیطی و بهبود بهره‌وری انرژی خوراک را به دنبال داشته است (Manso و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین، چربی‌های غیراشباع در بهبود بهره‌وری تولیدمثل و تقویت سیستم ایمنی دام‌ها نیز نقش دارد (Gardinal و همکاران، ۲۰۱۸؛ Gardinal و همکاران، ۲۰۱۸). برخی از چربی‌ها علاوه بر افزایش تولید، موجب بهبود کیفیت محصولات و فرآورده‌های دامی نیز می‌گردند که در دهه‌های اخیر به‌شدت موردتوجه مصرف‌کنندگان قرارگرفته است (Bodkowski و همکاران، ۲۰۲۰). در این راستا، روغن‌های گیاهی همچون روغن سویا با محتوی بالای اسید لینولئیک و روغن ماهی با محتوی بالای اسیدهای چرب امگا ۳، ایکوزاپنتانوئیک اسید[1] و دوکوزاهگزانوئیک اسید[2] (Shingfield و همکاران، ۲۰۰۳) موجب افزایش غلظت ترکیبات زیست فعال همچون اسیدهای چرب مزدوج[3] و امگا ۳ در فرآورده‌های دامی می‌شود که اثرات مثبتی بر سلامتی انسان داشته و خطر بیماری‌های قلبی عروقی و چاقی را کاهش می‌دهد (Santos و همکاران، ۲۰۱۷؛ Shokryazdan و همکاران، ۲۰۱۷).

از طرف دیگر، افزودنی‌های خوراکی نیز از جمله ترکیباتی هستند که موجب بهبود کارایی تولید دام‌ها ازجمله نشخوارکنندگان، عمدتاً به‌واسطه بهبود عملکرد هضم و تخمیر شکمبه می‌گردند (Honan و همکاران، ۲۰۲۱.، Torres و همکاران، ۲۰۲۰؛ Wanapat و همکاران، ۲۰۱۳). با این وجود، همان‌طور که قبلاً اشاره شد، با توجه به اهمیت روز افزون کیفیت محصولات و توجه ویژه مصرف‌کنندگان به شاخص‌های سلامتی و کیفیت فرآورده‌های دامی در دهه‌های اخیر، افزودنی‌های با منشأ طبیعی و سبز در سال‌های اخیر موردتوجه محققین تغذیه دام قرارگرفته‌اند (Benchaar و همکاران، ۲۰۰۸.،Zhou و همکاران، ۲۰۲۰). در این رابطه، عصاره‌ها و روغن‌های اسانسی با منشأ گیاهی از جمله افزودنی‌هایی بوده‌اند که استفاده از آن‌ها، به‌خصوص با ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد در بسیاری از کشورها طی دهه‌های گذشته به‌طور گسترده‌ای با هدف اصلاح تخمیر شکمبه و در نتیجه بهبود عملکرد تولید دام‌ها و همچنین ارتقاء کیفیت فرآورده‌های دامی موردمطالعه قرار گرفته‌اند (Kahvand و همکاران، ۲۰۱۸؛ Kholif و همکاران، ۲۰۲۱). مرزه خوزستانی[4] یکی از گونه‌های گیاهی معطر متعلق به تیره نعنائیان است که بومی ارتفاعات زاگرس، به‌ویژه شمال

1. Eicosapentaenoic acid (EPA)
2. Docosahexaenoic acid (DHA)
3. Conjugated linoleic acid (CLA)
4. Savory *(Satureja khuzistanica)* (SK)

استان خوزستان بوده و در این منطقه عمدتاً به‌عنوان طعم‌دهنده در غذاها مورداستفاده قرار می‌گیرد (Abbasi و همکاران، ۲۰۱۷). تحقیقات انجام‌شده نشان داده است که این گیاه حاوی روغن اسانسی بالایی است (تا ۴/۵٪ ماده خشک) که کارواکرول جزء اصلی تشکیل‌دهنده روغن اسانسی آن محسوب می‌شود (Abbasi و همکاران، ۲۰۱۷؛ AbuGhazaleh و همکاران، ۲۰۰۲). با توجه به محتوی بالای کارواکرول با خاصیت آنتی‌باکتریال قوی (Burt، ۲۰۰۴؛ Dorman و Deans، ۲۰۰۰) در روغن اسانسی مرزه خوزستانی، به نظر می‌رسد اسانس این گیاه پتانسیل بالایی جهت اصلاح تخمیر شکمبه دارد، با این‌حال، اطلاعاتی در این زمینه در منابع وجود ندارد. آزمایش حاضر به‌عنوان بخشی از یک تحقیق جامع با هدف کلی بررسی اثرات ترکیبات ثانویه گیاه مرزه خوزستانی بر عملکرد و کیفیت شیر دام‌های مزرعه‌ای تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی روغن ماهی و سویا (با هدف بررسی امکان غنی‌سازی فرآورده‌های دامی با اسیدهای چرب زیست فعال تولیدشده در شکمبه با منشأ روغن‌های گیاهی) بود که در مرحله اول، اثرات روغن اسانسی آن بر تخمیر شکمبه موردبررسی قرار گرفت. لذا هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی بر فراسنجه‌های تخمیر، سنتز پروتئین میکروبی و جمعیت‌های پرتوزوآیی در دو جیره حاوی روغن سویا و روغن ماهی و همچنین مطالعه اثرات متقابل بین روغن اسانسی و روغن‌های مذکور با توجه به ماهیت آب‌گریز هر دو (روغن اسانسی و روغن‌های گیاهی) بر پارامترهای یاد شده در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر طی سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰ در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه تغذیه دام دانشگاه بوعلی سینا انجام گرفت.

نمونه‌های گیاهی مرزه خوزستانی، استخراج و تعیین ترکیب شیمیایی روغن اسانسی با استفاده از گاز کروماتوگرافی کوپل شده با طیف‌سنج جرمی[1]: نمونه‌های گیاهی مرزه خوزستانی در اوایل مرحله گلدهی در اردیبهشت‌ماه از چندین منطقه در ارتفاعات استان خوزستان جمع‌آوری‌شده و سپس باهم مخلوط گردید تا یک نمونه معرف به دست آید. سپس نمونه معرف تا رسیدن به یک وزن ثابت در سایه خشک گردید و برای استخراج روغن اسانسی در کیسه‌های پلاستیکی در بسته نگهداری شد. روغن اسانسی مرزه خوزستانی[2] به روش تقطیر با بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج و روغن حاصله در و یال‌های رنگی و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز ترکیب شیمیایی آن نگهداری گردید. ترکیب شیمیایی روغن اسانسی مرزه خوزستانی با استفاده از یک دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به یک آشکارساز انتخابی جرمی[3] و یک ستون مویی[4] (۳۰ متر × ۰/۲۲ میلی‌متر، ضخامت فیلم = ۰/۲۵ میکرون) مطابق با دستورالعمل توضیح داده‌شده توسط Kahvand و Malecky (۲۰۱۸) تعیین شد.

تیمارها و انکوباسیون‌ها: در تحقیق حاضر دوزهای مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی شامل سطح صفر (به‌عنوان شاهد) و سطوح ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (دوز پایین)، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (دوزهای متوسط) و ٦۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (دوز بالا) به‌عنوان فاکتور اول و نوع جیره (جیره مکمل شده با ۲ درصد ماده خشک جیره روغن سویا[5] و روغن ماهی[6]) به‌عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. انکوباسیون‌های ۲٤ ساعته در ٦ تکرار برای هر سطح تیماری و طی دو

1. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)
2. *Satureja khuzistanica* essential oil (SKEO)
3. GC-MS, Shimadzu 2010 Plus, Japan, Kyoto
4. BP-5 column
5. Soybean oil diet (SOD)
6. Fish oil diet (FOD)

مرحله انجام گرفت. در انکوباسیون‌های مرحله اول، تولید گاز ۲٤ ساعته، تجزیه‌پذیری سوبسترا، شاخص‌های تخمیر و پروتئین میکروبی تعیین گردید و در انکوباسیون‌های مرحله دوم اثرات تیمارها بر جمعیت‌های پروتوزوآیی موردبررسی قرار گرفت. همه انکوباسیون‌ها در دو روز مختلف تکرار گردید.

آزمون تولید گاز: آزمون تولید گاز مطابق با روش Menke و Steingass (۱۹۸۸) انجام شد. در این آزمایش مایع شکمبه از سه رأس قوچ بالغ نژاد مهربان (٤/٥±٥٠ کیلوگرم وزن بدن) دارای فیستولای شکمبه‌ای جمع‌آوری شد. قوچ‌ها در یک جایگاه استاندارد و بهداشتی نگهداری شده و دو بار در روز با یک جیره نگهداری متشکل از ۷۰۰ گرم یونجه و ۳۰۰ گرم جو (با محتوی انرژی قابل سوخت‌وساز ۹/۵۸ مگا ژول و ۱۳۷ گرم پروتئین خام به ازای هر کیلوگرم ماده خشک) تغذیه می‌شدند. نمونه‌های مایع شکمبه گرفته شده بعد از مخلوط شدن و تهیه یک نمونه معرف، با استفاده از پارچه متقال چهار لایه صاف شد و داخل یک فلاسک عایق حرارتی به آزمایشگاه منتقل گردید و تحت جریان گاز دی‌اکسید کربن در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد تا شروع آزمایش نگهداری شد. سوبسترای تخمیر در این آزمایش یک جیره غذایی برای گاوهای شیرده در اوایل شیردهی بود (جدول ۱).

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیائی جیره‌های آزمایشی (بر اساس ماده خشک)

Table 1- The Ingredients and chemical composition of experimental diets (DM basis)

جیره‌های آزمایشی Experimental diets		اجزای خوراکی (درصد) Ingredients	
جیره حاوی روغن سویا SOD	جیره حاوی روغن ماهی FOD		
۲۱	۲۱	Alfalfa hay	علف یونجه
۱۹	۱۹	Corn Silage	سیلاژ ذرت
۱۷/۸	۱۷/۸	Barley grain	دانه جو
۱٦	۱٦	Corn grain	دانه ذرت
۱/٤	۱/٤	Wheat bran	سبوس گندم
۱٤/٥	۱٤/٥	Soybean, Meal	کنجاله سویا
٦	٦	Canola meal	کنجاله کانولا
-	۲	Fish oil	روغن ماهی
۲	-	Soybean oil	روغن سویا
۰/٦	۰/٦	Sodium bicarbonate	بی کربنات سدیم
۰/٥	۰/٥	Salt	نمک
۰/۷۲	۰/۷۲	Vitamin and mineral premix	مکمل ویتامینه و معدنی [1]
۰/٤۸	۰/٤۸	Calcium Carbonate	کربنات کلسیم
		Chemical composition	**ترکیب شیمیایی**
۱۷	۱۷	Crude protein (%)	پروتئین خام (درصد)
۲۹/٥	۲۹/٥	NDF(%)	الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد)
۱۰/۹٦	۱۰/۹٦	Metabolizable Energy (Mcal/Kg)	انرژی متابولیسمی (مگاکالری در کیلوگرم)[3]

۱. حاوی ویتامین A (۱۰۵۰ کیلو IU / کیلوگرم)، ویتامین D (۲٦۰ کیلو IU/ کیلو)، ویتامین E (۱۲۰۰۰IU/کیلو)، کلسیم (٤٥۰ گرم/کیلو)، منیزیوم (۲۰ گرم/ کیلو)، منگنز (٤ گرم/ کیلو)، کبالت (۱۱۰ میلی‌گرم/ کیلو)، مس (۳۷٦۰ میلی‌گرم/ کیلو)، ید (۱۷۸ میلی‌گرم/ کیلو)، روی (۱٥۳٦۰ میلی‌گرم/کیلو)، سلنیوم (٥۲ میلی گرم/ کیلو)، آهن (٥۰۹۰ میلی‌گرم/کیلو).

1.Contains 1050 KIU of Vitamin A; 260 KIU of Vitamin D3 and 12000 IU of Vitamin E and 450 g Ca, 20 g Mg, 4g Mn, 110 mg Co,3760 mg Cu, 178 mg I, 15360 mg Zn, 52 mg Se and 5090 mg Fe to Kg.

برای انکوباسیون، مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از هر کدام از سوبستراهای تخمیر (سوبسترای حاوی روغن سویا و روغن ماهی) به همراه ۳۹/۸ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری شده و ۲۰۰ میکرو لیتر نمونه حاوی سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی به مدت ۲۴ ساعت به‌صورت بی‌هوازی در سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری در ٦ تکرار انکوبه گردید (Makkar و همکاران، ۱۹۹۵). مایع شکمبه بافری شده با مخلوط نمودن مایع شکمبه و بافر به نسبت یک به دو تهیه شد (جدول ۲).

جدول ۲- اجزای بافر استفاده شده برای انکوباسیون

Table 2- The Ingredients of the incubation buffer

اجزای بافر Ingredients		(میلی‌لیتر/لیتر) ml/L
محلول معدنی ماکرو[1]	Macro-minerals solutin	۲۳۷
محلول معدنی میکرو[2]	Micro-minerals solution	۰/۱۲
محلول بافر بی‌کربنات[3]	Bicarbonate buffer solution	۲۳۷
محلول رزازورین[4]	Resazurin solution	۱/۲۲
محلول احیاکننده[5]	Reducing solution	۵۰
آب مقطر	Distilled water	٤٧٤/٧

۱- حاوی۵/۷ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات، ٦/۲ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/٦ گرم سولفات منیزیم

1- Contains of 5.7 g Na_2HPO_4, 6.2 g KH_2PO_4, 0.6 g $MgSO_47H_2O$ added up to 1,000 ml with water.

۲- حاوی ۱۳/۲ گرم کلرید مس، ۱۰ گرم کلرید منگنز،۱ گرم کلرید کبالت، ۸گرم کلرید آهن در ۱ لیتر آب مقطر

2- Contains of 13.2 g $CuCl_22H_2O$, 10.0 g $MnCl_24H_2O$, 1.0 g $CoCl_26H_2O$, 8.0 g $FeCl_26H_2O$ and made up to 100 ml with water.

۳- حاوی ۳۵ گرم بی‌کربنات سدیم و ٤ گرم کربنات آمونیوم در ۱ لیتر آب مقطر

3- Contains of 35 g $NaHCO_3$ and 4 g NH_4HCO_3 added up to 1,000 ml with water.

٤- حاوی ۰/۵ گرم رزازورین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر

4- Contains of of 0.5 g resazurin up to 100 ml with water.

۵- حاوی ۹۵ میلی‌لیترآب مقطر، ٤ میلی‌لیتر سود ۱ نرمال و ٦۲۵ میلی‌گرم دی سدیم سولفید

5- Contains of 95 ml H_2O, 4 ml 1 N-NaOH and 625 mg Na_2S9H_2O

تعداد سه سرنگ حاوی مایع شکمبه بافری شده بدون سوبسترا به‌عنوان بلانک استفاده شد. با توجه به محدودیت حجم سرنگ‌ها، گاز تولیدی در زمان‌های ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از انکوباسیون اندازه‌گیری شده و پس از تخلیه، حجم گاز تجمعی محاسبه گردید. در پایان انکوباسیون، تمامی محتویات سرنگ‌ها به لوله‌های فالکون منتقل‌شده و بلافاصله در آب یخ خنک شد تا تخمیر متوقف شود. سپس تعداد سه نمونه (تکرار) در هر سطح تیماری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی پس از فیلتراسیون با کاغذ صافی واتمن ٤، نمونه‌های ٤ میلی‌لیتری از آن با ۱ میلی‌لیتر اسید ارتوفسفریک ۲۵ درصد مخلوط شده و جهت تعیین محتوی اسیدهای چرب فرار در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین نمونه‌هایی با حجم ٤ میلی‌لیتر از مایع رویی با حجم مساوی اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال تثبیت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای آنالیز آمونیاک ذخیره شد. باقیمانده هضم نشده سوبسترا در لوله‌ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ٦۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک‌شده و وزن آن‌ها تعیین گردید. سپس بقایای خشک‌شده به مدت ۱ ساعت در محلول

شویندهٔ خنثی جوشانده شده و با استفاده از پارچه پلی‌استر (با قطر منافذ ٤٠ میکرومتر) صاف و دوباره به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٦٠ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شده و میزان تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی ماده خشک[1] تعیین گردید. میزان تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی ماده آلی[2] بعد از تعیین محتوی خاکستر بقایای خشک حاصله از مرحلهٔ قبل برآورد گردید. در این آزمایش، نسبت ماده آلی هضم شده‌ی حقیقی (میلی‌گرم) به حجم گاز تولیدی (میلی‌لیتر) بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون به‌عنوان فاکتور تفکیک[3] (١٠) و اختلاف وزنی (بر اساس ماده خشک) بین بقایای هضم نشده سوبسترا در انتهای انکوباسیون و مقدار باقیمانده بعد از شستشو در محلول شویندهٔ خنثی به‌عنوان زیست‌تودهٔ میکروبی[4] در نظر گرفته شد (١١).

تعیین محتوی پروتئین میکروبی: از ٦ نمونه (تکرار) انکوبه شده، تعداد سه نمونه باقی‌مانده برای تعیین محتوای پروتئین میکروبی نمونه‌ها مطابق با روش Makkar و همکاران (١٩٨٢) استفاده گردید. برای این منظور، نمونه‌ها در همزن مغناطیسی به مدت ٤٥ ثانیه تکان داده شدند تا میکروب‌های چسبیده به ذرات خوراک جدا شوند. سپس برای حذف پروتوزوآها و ذرات خوراکی درشت، نمونه‌ها به مدت ٥ دقیقه با سرعت ٤٠٨ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از حذف رسوب به‌دست‌آمده، نمونه‌های ٥ میلی‌لیتری از مایع رویی به مدت ٢٠ دقیقه با سرعت ٢٥٠٠٠ در دقیقه سانتریفیوژ گردید، مایع رویی دور ریخته و باقیمانده با بافر مک دوگال شسته شد و سپس مجدداً در ٢٥٠٠٠ در دقیقه به مدت ٢٠ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته و پلت میکروبی باقیمانده در ١٥ میلی‌لیتر سود ٠/٢٥ نرمال حل گردیده و به مدت ١٠ دقیقه در آب جوش انکوبه شد. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ٣٠ دقیقه با سرعت ٢٥٠٠٠ در دقیقه سانتریفیوژ شد و نمونه‌های ٠,٥ میلی‌لیتری از مایع رویی جهت اندازه‌گیری پروتئین میکروبی بر اساس روش Lowry و همکاران (١٩٥١) با استفاده از آلبومین سرم گاو به‌عنوان استاندارد استفاده گردید.

شمارش پروتوزوآ: برای شمارش پروتوزوآ، یک مجموعه جداگانه از انکوباسیون‌های ٢٤ ساعته تحت تیمارهای مذکور با شرایط ذکرشده قبلی در سه تکرار انجام شد. شناسایی و شمارش پروتوزوآها مطابق با روش توصیف‌شده توسط Dehority (٢٠٠٣) صورت گرفت. برای این منظور، بعد از اتمام انکوباسیون، محتویات سرنگ‌ها بدون صاف کردن وارد لوله فالکون ١٠٠ میلی‌لیتری گردید. سپس نمونه‌های ١٠ میلی‌لیتری از محتوای لوله‌ها با ١٠ میلی‌لیتر فرمالین ٥٠ درصد (١٨/٥ درصد فرمالدئید حجمی) مخلوط شده و در دمای ١٠ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت شناسایی و شمارش، دو قطره رنگ برلیان سبز (تهیه‌شده از مخلوط دو گرم برلیان سبز و ٢ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال در ١٠٠ میلی‌لیتر آب مقطر) به هر نمونه اضافه شد، سپس کاملاً مخلوط شده و اجازه داد شد تا یک شب در دمای اتاق بماند. روز بعد با استفاده از یک اسلاید شمارش پروتوزوآها[5] با پنج تکرار شمارش انجام شد.

آنالیزهای شیمیایی: تمامی آزمایشات مربوط به آنالیز شیمیایی خوراک در آزمایشگاه تغذیه دام وابسته به دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام گردید. محتوی ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، خاکستر خام و عصاره اتری مطابق با روش‌های انجمن رسمی شیمی‌دانان

1. *In vitro* true dry matter degradability (IVTDMD)
2. *In vitro* true organic matter degradability (IVTOMD)
3. Partitioning Factor (PF)
4. Microbial Biomass (MB)
5. Hawksley and Sons Limited ،Lancing ،Sussex ، UK

کشاورزی[6] اندازه‌گیری شد. همچنین محتوی الیاف نامحلول در شوینده خنثی مطابق با روش Van Soest و همکاران (۱۹۹۱) تعیین شد. غلظت آمونیاک در نمونه‌های محیط کشت با استفاده از روش فنل-هیپوکلریت و به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید (Broderick و Kang ۱۹۸۰،). غلظت اسیدهای چرب فرار نمونه‌ها بر اساس روش Ottenstein و Bartley (۱۹۷۱) با استفاده از یک دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به یک آشکارساز یونش شعله‌ای[7] و یک ستون مویین[8] (۵۰ متر × ۰/۵۳ میلی‌متر، ضخامت فیلم = ۲ میکرومتر) اندازه‌گیری شد. از هیدروژن به‌عنوان گاز حامل با نرخ دبی ثابت ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. دمای آون به صورتی برنامه‌ریزی شد که دمای اولیه ستون به مدت ۱ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. سپس با نرخ افزایش ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در آن دما به مدت ۵ دقیقه نگه‌داشته شد. دمای تزریق و آشکارساز به ترتیب در ۲۲۰ و ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شدند.

آنالیز آماری: همان‌طور که قبلاً اشاره شد، تمامی انکوباسیون‌ها در دو روز مختلف تکرار گردید و داده‌ها در قالب یک طرح فاکتوریل ۲ (نوع روغن) در ۵ (سطوح مختلف روغن اسانسی) و به‌صورت تجزیه مرکب به کمک رویه MIXED نرم‌افزار SAS و با استفاده از مدل زیر مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + A_i * B_j + D_k + e_{(ij)k} + A_i \times D_k + B_j \times D_k + A_i \times B_j \times D_k + E_{ijkl}$$

که در آن μ: میانگین، A_i: اثر فاکتور اول، B_j: اثر فاکتور دوم، $e_{(ij)k}$: اثر خطای اصلی ناشی از تکرارهای مرتب‌شده در روز، D_k: اثر روز و e_{ijkl}: خطای باقیمانده می‌باشند که در بین آن‌ها فاکتور اول و دوم و اثرات متقابل بین آن‌ها بعنوان اثرات ثابت و بقیه متغیرها به‌عنوان عوامل تصادفی در نظر گرفته شد. داده‌های مربوط به جمعیت‌های پروتوزوآیی با توجه به ماهیت داده‌ها، برای هر کدام از روغن‌های سویا و ماهی به‌طور جداگانه و به‌صورت ناپارامتری مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. همچنین روند پاسخ (خطی و درجه دو) به سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه با استفاده از مقایسه‌های اورتوگونال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمارها، حداقل مربعات میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی کرامر در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین سطح احتمال بین ۵ و ۱۰ درصد محدوده تمایل به معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی روغن اسانسی مرزه خوزستانی: بر اساس نتایج حاصل از آنالیز گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف سنج جرمی، کارواکرول، γ-ترپینن، پاراسیمن و α-ترپینن به ترتیب با ۷۱/۶، ۸/۸، ۵/۹ و ۳/۸ درصد از کل اجزای تشکیل‌دهنده، ترکیبات اصلی روغن اسانسی مرزه خوزستانی بودند. بر اساس این نتایج، کارواکرول با خاصیت ضد میکروبی قوی (Burt، ۲۰۰۴؛ Farsam و همکاران، ۲۰۰۴) ترکیب اصلی روغن اسانسی مرزه بود که در تحقیقات پیشین به‌طور گسترده‌ای در شرایط آزمایشگاهی موردمطالعه قرارگرفته است (Reyes-Becerril و همکاران، ۲۰۲۱.، Silva و همکاران، ۲۰۲۱).

اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی و نوع جیره (جیره حاوی روغن سویا و ماهی) بر فراسنجه‌های هضم و تخمیر شکمبه‌ای: اطلاعات مربوط به اثرات اصلی تیمارها بر

1. Association of Official Analytical Chemists (AOAC,2000)
7. GC-FID, Shimadzu 2010, Japan, Kyoto
8. CP-Wax 58 FFAP CB

فراسنجه‌های تخمیر در جدول ۳ و اثرات متقابل (اثرات سطوح اسانس به‌طور جداگانه در جیره‌های حاوی روغن سویا و ماهی) در جدول ٤ ارائه‌شده است. بر اساس نتایج جدول ۳، هیچ‌کدام از فراسنجه‌های تخمیر معرفی‌شده در این جدول، تحت تأثیر نوع روغن استفاده‌شده در جیره قرار نگرفت (P>۰/۰۵). با توجه به شباهت دو روغن سویا و ماهی به لحاظ محتوی بالای اسیدهای چرب غیراشباع، عدم وجود تفاوت معنی‌دار در شاخص‌های تخمیر در دو جیره منطقی به نظر می‌رسد.

با این حال، به‌موازات افزایش دوز روغن اسانسی مرزه، گاز ٢٤ ساعته[9] در هر دو جیره به‌طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۱) و اثرات متقابل بین سطح اسانس و نوع روغن برای این فراسنجه معنی‌دار نبود. تقریباً نتایج مشابهی برای میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک و آلی تحت تأثیر سطوح اسانس مشاهده گردید. به‌طوری‌که میزان تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی ماده خشک و ماده آلی با افزایش سطح اسانس در محیط کشت به‌طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۱) و اثرات متقابل بین سطح اسانس و نوع روغن در این رابطه معنی‌دار نبود.

در این راستا و در تحقیقی که توسط Talebzadeh و همکاران (۲۰۱۲) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد، کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در تولید گاز و همچنین هضم ماده خشک و آلی بهنگام استفاده از روغن اسانسی آویشن شیرازی مشاهده شد که به فعالیت ضدمیکروبی کارواکرول به‌عنوان ترکیب اصلی آن نسبت داده شد. همچنین در مطالعه دیگری Macheboeuf و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که استفاده از پونه کوهی با محتوی بالای کارواکرول منجر به کاهش در تولید گاز و هضم سوبسترا در شرایط آزمایشگاهی گردید.

برخلاف فراسنجه‌های قبلی، فاکتور تفکیک و توده میکروبی با افزایش دوز اسانس به‌طور خطی و درجه دو افزایش یافتند (P<۰/۰۵)، اثرات متقابل بین نوع روغن و سطح اسانس برای این فراسنجه‌ها معنی‌دار نشد. همچنین، پروتئین میکروبی و کارایی سنتز پروتئین میکروبی[10] با افزایش سطح اسانس در محیط کشت به‌طور غیرخطی افزایش یافتند (P<۰/۰۱) و اثرات متقابل بین نوع روغن و سطح اسانس تنها برای پروتئین میکروبی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، افزایش خطی فاکتور تفکیک به‌موازات افزایش دوز اسانس، با افزایش توده میکروبی و به خصوص پروتئین میکروبی هم‌خوانی داشت. با توجه به اینکه فاکتور تفکیک شاخصی از نسبت توزیع ماده آلی هضم شده در مسیر متابولیکی سنتز توده میکروبی به مسیر متابولیکی تولید انرژی و گاز می‌باشد، افزایش این فاکتور می‌تواند دلیلی بر تقویت مسیر سنتز توده میکروبی باشد (Blummel و همکاران، ۱۹۹۷). همچنین، افزایش توده میکروبی در دوزهای پایین و متوسط اسانس مرزه و همین‌طور افزایش خطی پروتئین میکروبی علی‌رغم کاهش هضم مواد آلی، می‌تواند مبین اثرات انتخابی این اسانس به‌خصوص در دوزهای پایین و متوسط بر جمعیت‌های میکروبی مختلف شکمبه باشد. در تأیید این نظر می‌توان به نتایج مربوط به جمعیت پروتوزوآی شکمبه و همچنین غلظت و ترکیب اسیدهای چرب فرار اشاره نمود. در حقیقت افزایش بارزتر پروتئین میکروبی (تا ۱۹ درصد افزایش در بالاترین سطح اسانس نسبت به شاهد) در مقایسه با توده میکروبی (تا ۱۲ درصد افزایش در سطح ٤٥٠ میلی‌گرم بر لیتر اسانس) می‌تواند در نتیجه اثرات مختلف اسانس مرزه بر جمعیت باکتریایی و

1. Gas produced after 24 h of incubation(GP_{24})

10. Efficiency of microbial protein synthesis(EMPS)

پروتوزوآیی باشد. به نظر می‌رسد با کاهش پروتوزوآها، شرایط مطلوب‌تری برای باکتری‌ها فراهم‌شده باشد که منجر به بهبود نسبی تولید کل اسیدهای چرب فرار[11] در دوزهای پایین و متوسط و همچنین افزایش پروتئین میکروبی گردیده است. این واقعیت با اطلاعات مربوط به بهره‌وری سنتز پروتئین میکروبی نیز کاملاً همخوانی دارد. لذا در این رابطه می‌توان به این نتیجه رسید که با توجه به نقش ۲۰ تا ۵۰ درصدی پروتوزوآی شکمبه در باز چرخ پروتئین باکتریایی (Williams و Coleman، ۱۹۹۲)، کاهش جمعیت پروتوزوآیی منجر به بهبود بهره‌وری سنتز پروتئین باکتریایی و در نهایت پروتئین میکروبی شده است. درنتیجه می‌توان اذعان داشت با توجه به سهم اندک پروتوزوآی شکمبه در تأمین پروتئین میکروبی رسیده به روده کوچک (Sylvester و همکاران، ۲۰۰۵.، Belanche و همکاران، ۲۰۱۱)، شاخص پروتئین میکروبی که در اندازه‌گیری آن پروتوزوآها حذف‌شده‌اند، یک پیش‌بینی دقیق‌تری نسبت به توده میکروبی (توده حاوی پروتئین باکتریایی و پروتوزوآیی) از پروتئین تأمین‌شده برای حیوان میزبان از منشأ میکروب‌های شکمبه باشد

در جدول اثرات متقابل (جدول ٤)، روند تغییرات پروتئین میکروبی در جیره‌های حاوی روغن سویا و روغن ماهی متفاوت بود، به‌طوری‌که به‌موازات افزایش سطح اسانس، پروتئین میکروبی در جیره حاوی روغن سویا به‌صورت خطی و درجه دو (P<۰/۰۱) و در جیره حاوی روغن ماهی به‌صورت خطی افزایش یافت (P<۰/۰۱) و این افزایش در جیره حاوی روغن ماهی بیشتر بود. با توجه به کاهش نسبی پروتئین میکروبی در سطح بالای اسانس در جیره حاوی روغن سویا، این احتمال وجود دارد که اثرات متقابل مؤثرتر بین روغن اسانسی مرزه و روغن ماهی، اثرات منفی اسانس مرزه به‌خصوص در دوز بالا را برای میکروب‌های شکمبه کاهش داده باشد که البته این موضوع نیازمند تحقیق بیشتری است.

در آزمایش حاضر، با افزایش سطح اسانس در محیط کشت، غلظت آمونیاک شکمبه‌ای به‌طور غیرخطی کاهش یافت (P<۰/۰۱)، اما اثرات متقابل برای این مؤلفه معنی‌دار نشد. کاهش غلظت آمونیاک شکمبه یکی دیگر از اثرات مثبت روغن اسانسی مرزه در این تحقیق بود که با نتایج مربوط به جمعیت پروتوزوآیی و پروتئین میکروبی کاملاً همخوانی دارد. تحقیقات انجام‌شده روی متابولیت‌های ثانویه گیاهی نشان داده که بسیاری از این ترکیبات به‌واسطه مکانیسم‌های مختلف همچون کاهش تجزیه پروتئین جیره‌ای، کاهش فعالیت دآمیناسیونی میکروب‌ها، کاهش جمعیت پروتوزوآیی و بهبود سنتز پروتئین میکروبی موجب کاهش غلظت آمونیاک شکمبه‌ای می‌شوند (Carreño و همکاران، ۲۰۱۵؛ Hegarty و Klieve، ۱۹۹۹؛ Hundal و همکاران، ۲۰۱۹). در حقیقت پروتوزوآها یکی از گروه‌های میکروبی شکمبه هستند که قادر به استفاده از آمونیاک نبوده و خود تولیدکننده خالص آمونیاک محسوب می‌شوند (Bach و همکاران، ۲۰۰۵.، Onodera و همکاران، ۱۹۷۷). از طرف دیگر، بسیاری از جمعیت‌های میکروبی شکمبه مصرف‌کننده‌های آمونیاک بوده و لذا بهبود رشد آن‌ها منجر به کاهش غلظت آمونیاک می‌گردد (Nolan و Dobos، ۲۰۰۵؛ Zhou و همکاران، ۲۰۲۰). بنابراین، با کاهش جمعیت پروتوزوآیی و افزایش جمعیت باکتریایی، انتظار می‌رود که غلظت آمونیاک کاهش یابد که هم به لحاظ تغذیه‌ای و بهبود کارایی استفاده از نیتروژن جیره و هم به لحاظ کاهش اثرات زیست‌محیطی دفع نیتروژن حائز اهمیت است.

11. Total volatile fatty acid (TVFA)

جدول ۳- اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی و نوع جیره (جیره حاوی روغن سویا و ماهی) بر فراسنجه‌های هضم و تخمیر شکمبه‌ای

Table 3- The effects of different doses of the savory (*Satureja khuzistanica*) essential oil (SKEO) and diet type (soya- and fish oil containing diet) on digestibilities and fermentation parameters

P-value					SEM	سطح اسانس SKEO (mg L^{-1})					SEM	نوع جیره DT		فراسنجه‌ها Parameters
SKEO		DT*SKEO	SKEO	DT		600	450	300	150	0		ماهی FOD	سویا SOD	
Q	L													
0.443	<0.01	0.900	<0.01	0.296	2.77	107.1^{c}	112.3^{bc}	117.5^{bc}	120.7^{ab}	130^{a}	7.19	110.3	124.7	تولید گاز ۲۴ساعته GP_{24}
0.620	<0.01	0.990	<0.01	0.351	0.795	73.5^{d}	75.6^{cd}	77.9^{bc}	79.9^{ab}	81.5^{a}	0.68	77.1	78.2	تجزیه پذیری حقیقی ماده خشک TIVDMD(%)
0.541	<0.01	0.989	<0.01	0.238	0.697	74.7^{d}	76.6^{cd}	78.7^{bc}	80.6^{ab}	82.1^{a}	0.477	77.9	79.2	تجزیه پذیری حقیقی ماده آلی TIVOMD(%)
0.671	0.026	0.990	0.136	0.315	0.157	3.47	3.39	3.32	3.33	3.15	0.190	3.51	3.16	فاکتور تفکیک PF
<0.01	0.066	0.141	0.035	0.822	1.83	78.0^{ab}	84.3^{a}	82.5^{ab}	79.8^{ab}	75.1^{b}	1.87	79.7	80.2	توده میکروبی MB(mg)
0.026	<0.01	0.039	<0.01	0.219	1.10	78.7^{a}	77.2^{ab}	75.0^{ab}	72.6^{b}	66.2^{c}	0.78	75.0	72.9	پروتئین میکروبی MP(mg)
0.150	<0.01	0.917	0.028	0.392	1.43	35.1^{a}	35.4^{a}	33.2^{ab}	31.3^{ab}	28.0^{b}	0.691	33.1	32.1	بازده سنتز پروتئین میکروبی EMPS(g N kg^{-1}OM bacterial)
0.028	<0.01	0.940	<0.01	0.144	0.500	13.4^{c}	13.8^{c}	15.8^{b}	16.4^{b}	19.8^{a}	0.67	17.3	14.4	آمونیاک NH3(mmol L^{-1})

DT: نوع جیره حاوی روغن سویا (SOD) و ماهی (FOD)، DT*SKEO: اثرمتقابل نوع جیره در سطح اسانس، L: پاسخ خطی، Q: پاسخ درجه دوم.

$^{a-b}$ حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار (P <۰,۰۵) می باشد.

DT: Diet type (soya- and fish oil), DT*SKEO: interaction between diet type and SKEO dose, L: linear, Q: quadratic.

$^{a-b}$ Means with different superscript letters in rows are significantly different (P<0.05).

جدول ٤- اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی بر پروتئین میکروبی در جیره‌های حاوی روغن سویا و ماهی

Table 4- The effects of different doses of the savory (*Satureja khuzistanica*) essential oil (SKEO) on the microbial protein in soya- and fish oil containing diets (SOD and FOD).

P-Value			SEM	سطح اسانس در جیره حاوی روغن سویا SKEO (mg L^{-1}) in SOD					فراسنجه Parameter
Q	L	Tr		600	450	300	150	0	
0.004	0.002	0.005	1.46	74.2 ^{a}	78. 1 ^{a}	74.8 ^{a}	72.8 ^{a}	64.4 ^{b}	پروتئین میکروبی MP (mg)
P-Value			SEM	سطح اسانس مرزه در جیره حاوی روغن ماهی SKEO (mg L^{-1}) in FOD					فراسنجه Parameter
Q	L	Tr		600	450	300	150	0	پروتئین میکروبی
0.496	0.001	0.003	1.47	83.2 ^{a}	76.4 ^{b}	75.2 ^{b}	72.5 ^{bc}	67.9 ^{c}	MP (mg)

Tr: تیمار، L: پاسخ خطی، Q: پاسخ درجه دوم.

$^{a-b}$ حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P <۰/۰۵) می باشد.

Tr: treatment, L: linear, Q: quadratic.

$^{a-b}$ Means with different superscript letters in rows are significantly different (P<0.05).

اثرات روغن اسانسی مرزه خوزستانی بر جمعیت‌های پروتوزوآیی در جیره‌های حاوی روغن سویا و ماهی: تعداد کل پروتوزوآها در هر دو جیره حاوی روغن ماهی و سویا با افزایش دوز اسانس در محیط کشت کاهش یافت (P<۰/۰۱)، به‌طوری‌که در جیره حاوی روغن سویا و ماهی در بالاترین سطح اسانس، جمعیت پروتوزوآها به ترتیب به میزان ٦٠ و ٥٤ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول ٥). در بین الیگوتریش‌ها، انتودینیوم‌ها بالاترین جمعیت را داشتند و در هر دو جیره با افزایش سطح اسانس جمعیت آن‌ها به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت (P<۰/۰۱) که حاکی از اثرات آنتی پروتوزوآیی قوی این روغن اسانسی است. انتودینیوم‌ها درواقع کوچک‌ترین و معمول‌ترین پروتوزوآها در محیط شکمبه می‌باشند که خیلی زود در محیط شکمبه جایگزین می‌شوند (Dehority، ۲۰۰۳). جنس دیپلودینیوم دومین جنس به لحاظ تعداد در خانواده الیگوتریش‌ها بودند که علی‌رغم کاهش تعداد آن‌ها با افزایش دوز اسانس در هر دو جیره، تفاوت بین تیمارها معنی‌دار نگردید (P>۰/۰۵). این جنس، از پروتوزوآهای درشت شکمبه محسوب می‌شود که با توجه به نتایج حاضر به نظر می‌رسد مقاومت بیشتری به اسانس مرزه داشته باشد.

در این میان، جنس اپیدینیوم در هیچ‌کدام از سطوح تیماری در محیط کشت مشاهده نگردید. سایر جنس‌ها (از قبیل افریواسکولکس) در این خانواده تعداد کمی داشته و روند مشخصی از جمعیت آن‌ها تحت تیمار اسانس مرزه مشاهده نشد. در خانواده هولوتریش‌ها نیز جنس‌های ایزوتریش و داسی‌تریش تعداد کمی داشته و روند مشخصی برای این جمعیت‌ها مشاهده نشد. مطالعات قبلی انجام‌شده در این رابطه نشان داده که در مقایسه با نمونه‌های تازه مایع شکمبه گرفته‌شده از دام‌های زنده، جمعیت کلی پروتوزواها در محیط کشت‌های آزمایشگاهی پایین‌تر است که یکی از دلایل آن استفاده از برخی از نمک‌های پروتوزوآ زدا همچون سدیم لوریل سولفات در محلول بافر مورداستفاده برای تهیه محیط کشت است (Patel و Ambalam، ۲۰۱۸). در عین حال، استفاده از روغن‌های سویا و ماهی در محیط کشت در تحقیق حاضر نیز می‌تواند یکی دیگر از دلایل پایین بودن نسبی جمعیت کلی پروتوزوآها و غایب بودن برخی از جنس‌ها در گروه‌های مختلف تیماری باشد (Lovett و همکاران، ۲۰۰۳؛ Machmüller و همکاران، ۲۰۰۳). در مجموع، کاهش جمعیت کل پروتوزوآی شکمبه یکی دیگر از اثرات مثبت روغن اسانسی مرزه در اصلاح تخمیر شکمبه محسوب می‌شود که از جمله عوامل بهبود میزان و کارایی سنتز پروتئین میکروبی و کاهش غلظت آمونیاک شکمبه‌ای محسوب می‌شود. با توجه به مشارکت پروتوزوآها در

هضم بخش جامد و ذره‌ای جیره و همین‌طور نقش آن‌ها در تولید هیدروژن و نهایتاً متان به‌واسطه همزیستی و حمایت جمعیت متانوژن‌ها (Moss و همکاران، ۲۰۰۰؛ Talebzadeh و همکاران، ۲۰۱۲)، بخش قابل‌توجهی از کاهش هضم ماده خشک و آلی و همین‌طور کاهش تولید گاز در آزمایش حاضر می‌تواند درنتیجه کاهش چشمگیر جمعیت پروتوزوآیی باشد.

جدول ۵- اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی بر جمعیت‌های پروتوزوآیی درجیره‌های حاوی روغن سویا و ماهی

Table 5- The effects of different doses of the savory (*Satureja khuzistanica*) essential oil (SKEO) on the protozoal populations in soya- and fish oil containing diets (SOD and FOD).

Pr > Chi-Square	سطح اسانس در جیره حاوی روغن سویا SKEO (mg L^{-1}) in SOD					فراسنجه‌ها Parameters
	600	450	300	150	صفر	
<0.01	7.78±1.00	12.2±1.10	14.9±1.56	16.4±2.33	20.22±1.31	*انتودنیوم* *Entodinium*
0.549	1±1.10	1.33±1.03	1.31±1.63	1.33±1.03	2.33±1.51	*دیپلودنیوم* *Diplodinium*
0	0	0	0	0	0	*اپی دنیوم* *Epidinium*
0.028	0	0	0	0	1.00±1.10	*ایزوتریشا* *Isotricha*
0.082	0.33±0.82	1.08±1.06	0	1.0±1.1	0	*افریواسکولکس* *Ophryoscolex*
0.082	0	0	0.67±1.03	0	0	*داسی تریشا* *Dasytricha*
<0.01	9.1±1.31	14.6±1.42	16.9±3.39	18.8±3.08	23.6±2.52	کل پروتوزوآ Total number
Pr > Chi-Square	سطح اسانس مرزه در جیره حاوی روغن ماهی SKEO (mg L^{-1}) in FOD					فراسنجه‌ها Parameters
	600	450	300	150	صفر	
<0.01	8.89±1.38	11.6±0.69	15.3±0.73	16.9±1.09	19.4±0.66	*انتودنیوم* *Entodinium*
0.268	1.30±1.63	2.06±1.79	1.31±1.03	2.31±1.51	3.33±2.06	*دیپلودنیوم* *Diplodinium*
0	0	0	0	0	0	*اپی دنیوم* *Epidinium*
0.012	0	0	0	1.67±1.97	0	*ایزوتریشا* *Isotricha*
0.154	1.18±1.67	0	0	0	0.68±1.03	*افریواسکولکس* *Ophryoscolex*
<0.01	0	1.65±1.51	3.67±1.51	0	1.09±1.67	*داسی تریشا* *Dasytricha*
<0.01	11.2±1.86	15.2±1.54	20.3±1.83	20.9±2.85	24.4±3.39	کل پروتوزوآ Total number

[a-b] حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار (P <۰/۰۵) می باشد.

[a-b] Means with different superscript letters in rows are significantly different (P<0.05).

اثرات روغن اسانسی مرزه خوزستانی و نوع جیره (جیره حاوی روغن سویا و ماهی) بر غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه: غلظت کل اسیدهای چرب فرار در جیره حاوی روغن ماهی بالاتر از جیره حاوی روغن سویا بود (P<۰/۰۱). این مؤلفه با افزایش سطح اسانس مرزه به‌صورت غیرخطی تغییر کرد (P<۰/۰۱)، به‌طوری‌که بالاترین غلظت آن در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روغن اسانسی مشاهده گردید (جدول ٦). همچنین، اثرات متقابل بین نوع جیره و سطح اسانس برای غلظت کل اسیدهای چرب فرار معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). پروفایل اسیدهای چرب فرار نیز تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت، به‌طوری‌که در جیره حاوی روغن ماهی درصد مولی استات پایین‌تر (P<۰/۰۱) و درصد مولی پروپیونات بالاتر (P<۰/۰۵) از جیره حاوی روغن سویا بود. مشابه با استات، درصد مولی بوتیرات و اسیدهای چرب شاخه‌دار شامل ایزوبوتیرات[12] و ایزووالرات[13] و همینطور نسبت غلظتی استات به پروپیونات نیز در جیره حاوی روغن ماهی پایین‌تر از جیره حاوی روغن سویا بودند (P<۰/۰۱). همچنین، پروفایل اسیدهای چرب فرار نیز تحت تأثیر دوز اسانس قرار گرفت، در این میان، با افزایش دوز اسانس درصد مولی استات و پروپیونات به‌صورت درجه دو تغییر نمودند (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که پایین‌ترین درصد مولی استات و بالاترین درصد پروپیونات در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روغن اسانسی مشاهده گردید. علاوه بر این، با افزایش دوز اسانس، درصد مولی بوتیرات و ایزوبوتیرات بطور خطی تمایل به کاهش داشت (P<۰/۱۰) و درصد ایزووالرات بطور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۱). همچنین، نسبت غلظتی استات به پروپیونات با افزایش سطح اسانس به‌صورت درجه دو تغییر کرد (P<۰/۰۱)، به‌طوری‌که کمترین نسبت در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روغن اسانسی مشاهده گردید. در این میان، به جز پروپیونات، اثرات متقابل بین نوع جیره و سطح اسانس برای سایر اسیدهای چرب فرار معنی‌دار بود.

در جداول اثرات متقابل (جدول ۷ و ۸)، غلظت کل اسیدهای چرب فرار در هر دو جیره به‌طور غیرخطی تحت تأثیر سطوح روغن اسانسی قرار گرفت (P<۰/۰۱)، بااین‌وجود، بالاترین غلظت کل اسیدهای چرب فرار در جیره حاوی روغن سویا با حدود ۱۹ درصد افزایش نسبت به شاهد در سطح ۳۰۰ و در جیره حاوی روغن ماهی با حدود ۳۲ درصد افزایش نسبت به شاهد در سطح ٤٥٠ میلی‌گرم بر لیتر روغن اسانسی مشاهده گردید. به‌طور مشابه، درصد مولی استات در هر دو جیره به‌طور غیرخطی تحت تأثیر اسانس مرزه قرار گرفت (P<۰/۰۱)، با این وجود، پایین‌ترین درصد استات در جیره حاوی روغن سویا در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و در جیره حاوی روغن ماهی در سطح ٤٥٠ میلی‌گرم بر لیتر روغن اسانسی مشاهده شد. درصد مولی بوتیرات در جیره حاوی روغن سویا به‌صورت درجه دو افزایش یافت و بالاترین مقدار آن در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روغن اسانسی به دست آمد، اما در جیره حاوی روغن ماهی، درصد آن به‌موازات افزایش سطح اسانس تغییری نداشت. درصد مولی ایزو والرات نیز فقط در جیره حاوی روغن سویا به‌طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۱). نسبت غلظتی استات به پروپیونات در جیره حاوی روغن سویا تحت تأثیر سطوح اسانس قرار نگرفت، اما در جیره حاوی روغن ماهی به‌صورت غیرخطی کاهش یافت (P<۰/۰۵) که کمترین نسبت در سطح ٤٥٠ میلی‌گرم بر لیتر روغن اسانسی مشاهده گردید.

12. Iso-butyrate(i-C_4)
13. Iso-valerate(i-C_5)

جدول ٦- اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی و نوع جیره (جیره حاوی روغن سویا و ماهی) برپروفایل اسیدهای چرب فرار شکمبه

Table 6- The effects of different doses of the savory *(Satureja khuzistanica)* essential oil (SKEO) and diet type (soya- and fish oil contatining diet) on the rumen volatile fatty acids profiles

P-value					SEM	سطح اسانس SKEO (mg L^{-1})					SEM	نوع جیره DT		
SKEO		DT*SKEO	SKEO	DT		600	450	300	150	0		ماهی FOD	سویا SOD	
Q	L													
<.001	0.012	<.001	<.001	<.001	1.78	113.3^{c}	131.0^{b}	142.2^{a}	136.8^{b}	118.2^{c}	1.124	136.3^{a}	120.3^{b}	کل اسیدهای چرب فرار TotalVFA(Mmol/L)
پروفایل اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر ۱۰۰ میلی مول) volatile fatty acids profiles(Mmol 100^{-1} Mmol)														
<.001	0.214	0.001	0.001	<.001	0.174	55.0^{a}	54.5^{abc}	53.7^{c}	54.3^{bc}	54.8^{ab}	0.11	53.5^{b}	55.4^{a}	استات Acetate
0.028	0.663	0.132	0.158	<.001	0.216	23.8	23.9	24.4	24.1	23.6	0.137	25.6^{a}	22.3^{b}	پروپیونات Propionate
0.109	0.09	0.343	0.162	<.001	0.02	2.22	2.23	2.21	2.23	2.28	0.013	2.19^{b}	2.28^{a}	ایزوبوتیرات Iso-butyrat
0.113	0.065	0.053	0.127	<.001	0.086	13.5	13.6	13.8	13.7	13.7	0.055	13.0^{b}	14.2^{a}	بوتیرات Butyrate
0.251	0.005	0.013	0.031	<.001	0.039	2.65^{b}	2.73^{ab}	2.82^{ab}	2.78^{ab}	2.83^{a}	0.025	2.59^{b}	2.93^{a}	ایزووالرات Iso-valerat
0.019	0.908	0.016	0.113	0.001	0.085	2.83	3.13	3.09	2.97	2.9	0.054	3.14^{a}	2.83^{b}	والرات Valerate
0.005	0.695	0.0141	0.032	<.001	0.026	2.33^{ab}	2.31^{ab}	2.22^{b}	2.27^{ab}	2.33^{a}	0.017	2.09^{b}	2.49^{a}	نسبت استات به پروپیونات Acetate: Propionate

DT: نوع جیره حاوی روغن سویا (SOD) و ماهی (FOD)، DT*SKEO: اثرمتقابل نوع جیره در سطح اسانس، L: پاسخ خطی، Q: پاسخ درجه دوم.

$^{a-b}$ حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار (P <۰,۰۵) می‌باشد.

DT: Diet type (soya- and fish oil), DT*SKEO: interaction between diet type and SKEO dose, L: linear, Q: quadratic.

$^{a-b}$ Means with different superscript letters in rows are significantly different (P<0.05).

مشابه با پروتئین میکروبی، بالاتر بودن غلظت کل اسیدهای چرب فرار در جیره حاوی روغن ماهی در مقایسه با جیره حاوی روغن سویا، می‌تواند در نتیجه اثرات متقابل بین اسانس مرزه و روغن ماهی باشد. همان‌طور که قبلاً نیز عنوان شد، به نظر می‌رسد روغن ماهی (به دلیل برهمکنش با اسانس مرزه و احتمالاً کاهش دسترسی گروه‌های عاملی آن) اثرات منفی اسانس مرزه بر فعالیت برخی از میکروب‌های شکمبه به‌خصوص در دوزهای ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را کاهش داده باشد، به‌طوری‌که در مقایسه با سطح بهینه اسانس مرزه در جیره حاوی روغن سویا که برای غلظت کل اسیدهای چرب فرار ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد، در جیره حاوی روغن ماهی این سطح به ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش‌یافته است. از طرف دیگر، با توجه به تفاوت در پروفایل اسیدهای چرب فرار بین دو جیره و پایین‌تر بودن نسبت استات به پروپیونات در جیره حاوی روغن ماهی نسبت به جیره حاوی روغن سویا، به نظر می‌رسد افزایش بارزتر غلظت اسیدهای چرب فرار با افزایش سطح اسانس در جیره اول و تا حدودی جیره دوم بیشتر درنتیجه بهبود هضم و تخمیر در بخش محلول جیره و عمدتاً برای باکتری‌های آمیلولایتیک بوده باشد. لذا، با توجه به عدم امکان رصد دقیق تغییرات در هضم بخش محلول جیره در آزمون گاز تست (Getachew و همکاران، ۲۰۰۰؛ AbuGhazaleh و همکاران، ۲۰۰۲)، می‌توان گفت که احتمالاً بهبود در هضم این بخش در فراسنجه‌های مربوط به هضم ماده خشک و آلی منعکس نشده است. پایین‌تر بودن غلظت اسیدهای چرب شاخه‌دار در جیره حاوی روغن ماهی نسبت به جیره حاوی روغن سویا، با بالاتر بودن نسبی پروتئین میکروبی در جیره اول همخوانی دارد و حاکی از بهبود سنتز پروتئین میکروبی در این جیره است.

در رابطه با اثرات سطح اسانس بر اسیدهای چرب فرار، همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار در سطوح پایین و متوسط اسانس مرزه نسبت به شاهد در هر دو جیره، علی‌رغم کاهش تولید گاز و هضم ماده خشک و آلی می‌تواند در نتیجه اثرات متفاوت این اسانس بر جمعیت‌های مختلف میکروبی شکمبه، از جمله تفاوت در حساسیت باکتری‌ها و پروتوزوآها به این روغن اسانسی باشد (Castillejos و همکاران، ۲۰۰۸؛ Talebzadeh و همکاران، ۲۰۱۲). در این آزمایش، با افزایش دوز اسانس مرزه، جمعیت پروتوزوآیی به‌طور محسوسی کاهش یافت. با توجه به نقش پروتوزوآها در هضم بخش جامد و نامحلول خوراک و همچنین نقش غیرمستقیم آن‌ها در تولید گاز متان از یک طرف و همچنین بهبود رشد باکتری‌ها با حذف پروتوزوآها (افزایش پروتئین میکروبی) و نقش پررنگ‌تر آن‌ها در تولید اسیدهای چرب فرار از طرف دیگر، این نتایج منطقی به نظر می‌رسد (Hristov و همکاران، ۲۰۰۱؛ Santra و Karim، ۲۰۰۲). افزایش نسبت مولی پروپیونات و همین‌طور کاهش نسبت استات بر پروپیونات تا سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس مرزه، از اثرات مثبت این روغن اسانسی بر الگوی تخمیر شکمبه تلقی می‌شود که می‌تواند در نتیجه کاهش جمعیت پروتوزوآها و افزایش باکتری‌های تولیدکننده پروپیونات باشد (Garcia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Patel و Ambalam، ۲۰۱۸).

جدول ۷- اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی بر پروفایل اسیدهای چرب فرار درجیره‌های حاوی روغن سویا

Table 7- The effects of different doses of the savory (*Satureja khuzistanica*) essential oil (SKEO) on volatile fatty acids profiles in soya oil containing diets (SOD)

P-Value			SEM	سطح اسانس در جیره حاوی روغن سویا SKEO (mg L^{-1}) in SOD					فراسنجه‌ها Parameters
Q	L	Tr		600	450	300	150	0	
<.001	<.001	<.001	2.60	97.5 ^{c}	107.6 ^{bc}	141.6 ^{a}	135.8 ^{a}	119.1 ^{b}	کل اسیدهای چرب فرار Total VFA(Mmol/L)
				پروفایل اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر ۱۰۰ میلی مول) volatile fatty acids profiles(Mmol 100^{-1} Mmol)					
0.040	0.008	0.008	0.328	56.3 ^{a}	56.2 ^{a}	54.3 ^{b}	55.1 ^{ab}	55.1 ^{ab}	استات Acetate
0.03	0.087	0.063	0.146	13.9	14.1	14.6	14.4	14.20	بوتیرات Butyrate
0.360	0.004	0.038	0.076	2.71 ^{b}	2.85 ^{ab}	3.01 ^{ab}	2.99 ^{ab}	3.08 ^{a}	ایزووالرات Iso-valerat
0.707	0.105	0.246	0.083	2.75	2.74	2.91	2.77	2.97	والرات Valerate
0.157	0.087	0.070	0.047	2.55	2.58	2.37	2.45	2.47	نسبت استات به پروپیونات Acetate: Propionate

Tr: تیمار، L: پاسخ خطی، Q: پاسخ درجه دوم.

$^{a-b}$ حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار (P <۰/۰۵) می باشد.

Tr: treatment, L: linear, Q: quadratic.

$^{a-b}$ Means with different superscript letters in rows are significantly different (P<0.05).

اثرات متقابل بین اسانس مرزه و نوع جیره نیز حاکی از اثرات تا حدودی متفاوت اسانس مرزه بر الگوی تخمیر شکمبه در دو جیره حاوی روغن ماهی و جیره حاوی روغن سویا است. در این راستا، حداکثر غلظت کل اسیدهای چرب فرار در جیره حاوی روغن ماهی، در سطح ٤٥٠ میلی‌گرم بر لیتر اسانس مرزه مشاهده شد، درحالی‌که در جیره حاوی روغن سویا حداکثر این مؤلفه در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس به دست آمد؛ بنابراین به نظر می‌رسد اثرات مثبت کاهش پروتوزوآها بر تخمیر شکمبه، احتمالاً به دلیل اثرات منفی دوزهای بالاتر اسانس مرزه بر برخی از باکتری‌ها تا حد زیادی خنثی‌شده باشد، بااین‌حال، این اثرات منفی در جیره حاوی روغن ماهی ملایم‌تر بود. بر همین اساس، کمترین درصد مولی استات و نسبت استات به پروپیونات در جیره حاوی روغن سویا در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس و در جیره حاوی روغن ماهی در سطح ٤٥٠ میلی‌گرم بر لیتر اسانس دیده شد. در مجموع با توجه به نتایج مربوط به اسیدهای چرب فرار و پروتئین میکروبی به نظر می‌رسد روغن اسانسی مرزه در سطوح پایین و متوسط اثرات اصلاحی مثبتی بر تخمیر شکمبه داشته و تنها در سطح بالا (٦٠٠ میلی‌گرم بر لیتر) تخمیر میکروبی شکمبه را کاهش می‌دهد.

جدول ۸- اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی مرزه خوزستانی بر پروفایل اسیدهای چرب فرار درجیره‌های حاوی روغن ماهی

Table 8- The effects of different doses of the savory (*Satureja khuzistanica*) essential oil (SKEO) on volatile fatty acids profiles in fish oil containing diets (FOD)

P-Value			SEM	سطح اسانس در جیره حاوی روغن ماهی SKEO (mg L^{-1}) in FOD					فراسنجه‌ها Parameters
Q	L	Tr		600	450	300	150	0	
<.001	<.001	<.001	2.42	129.2 ^{c}	154.4 ^{a}	142.8 ^{b}	137.9 ^{bc}	117. 3 ^{d}	کل اسیدهای چرب فرار Total VFA(Mmol/L)
				پروفایل اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر ۱۰۰ میلی‌مول) volatile fatty acids profiles(Mmol 100^{-1} Mmol)					
<.001	<.001	<.001	0.119	53.7 ^{b}	52.7 ^{d}	53.2 ^{cd}	53.4 ^{bc}	54.4 ^{a}	استات Acetate
0.389	0.528	0.719	0.092	13.0	13.0	13.0	13.0	13.1	بوتیرات Butyrate
0.322	0.123	0.194	0.019	2.60	2.61	2.62	2.56	2.57	ایزووالرات Iso-valerat
0.010	0.288	0.049	0.149	2.91	3.52	3.27	3.17	2.82	والرات Valerate
0.003	0.017	0.009	0.024	2.10 ^{ab}	2.03 ^{b}	2.06 ^{b}	2.08 ^{ab}	2.19 ^{a}	نسبت استات به پروپیونات Acetate: Propionate

Tr: تیمار، L: پاسخ خطی، Q: پاسخ درجه دوم.

$^{a-b}$ حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار (P <۰/۰۵) می باشد.

Tr: treatment, L: linear, Q: quadratic.

$^{a-b}$ Means with different superscript letters in rows are significantly different (P<0.05).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که چربی‌های با ترکیب شیمیایی نزدیک به هم تقریباً اثرات مشابهی بر تخمیر شکمبه دارند. استفاده از روغن اسانسی مرزه علی‌رغم کاهش هضم ماده خشک و آلی، به‌صورت وابسته به دوز موجب کاهش غلظت آمونیاک شکمبه‌ای و همین‌طور افزایش پروتئین میکروبی و بهبود کارایی سنتز پروتئین میکروبی عمدتاً به واسطه حذف نسبی پروتوزوآها گردید که می‌تواند موجب افزایش بهره‌وری استفاده از خوراک گردد. کاهش جمعیت پروتوزوآها و افزایش جمعیت باکتری‌ها احتمالاً مهم‌ترین عامل افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار در دوزهای پایین و متوسط اسانس مرزه می‌باشد، اما دوزهای بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس به نظر موجب کاهش تخمیر شکمبه می‌گردد که البته اثرات منفی آن می‌تواند در نتیجه برهم‌کنش با روغن ماهی تعدیل گردد. در مجموع با توجه به این نتایج می‌توان به این نتیجه رسید که روغن اسانسی مرزه دارای پتانسیل بالایی جهت بهبود تخمیر شکمبه است که سطح بهینه آن بسته به نوع روغن مورداستفاده در جیره می‌تواند بین ۳۰۰ میلی‌گرم (برای جیره‌های حاوی روغن سویا) تا ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (برای جیره‌های حاوی روغن ماهی) باشد که البته نیازمند تحقیق بیشتر و تأیید توسط آزمایشات مزرعه‌ای می‌باشد.

منابع

AOAC, 2000. Official methods of analysis,17th ed. Association of official analytical chemists., VA, USA.

Abbasi, A., Maddah, S.M., Mahboubi, A., Khaledi, A., Vazini, H. and Esmaeili, D. 2017. Investigate the inhibitory effects of Satureja khuzestanica essential oil against housekeeping fabD and exoA genes of Pseudomonas aeruginosa from hospital isolates using RT-PCR technique. Annals of Medical and Health Sciences Research, 7: 246-250.

AbuGhazaleh, A., Schingoethe, D., Hippen, A., Kalscheur, K. and Whitlock, L. 2002. Fatty acid profiles of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. Journal of Dairy Science, 85: 2266-2276.

Alizadeh, A. R., Alikhani, M., Ghorbani, G.R., Rahmani, H.R., Rashidi, L. and Loor, J. J. 2012. Effects of feeding roasted safflower seeds (variety IL-111) and fish oil on dry matter intake, performance and milk fatty acid profiles in dairy cattle. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 96: 466-73.

Bach, A., Calsamiglia, S. and Stern, M. D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science, 88: E9-E21.

Belanche, A., Abecia, L., Holtrop, G., Guada, J., Castrillo, C., De La Fuente, G. and Balcells, J. 2011. Study of the effect of presence or absence of protozoa on rumen fermentation and microbial protein contribution to the chyme. Journal of Animal Science, 89: 4163-4174.

Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A. and Beauchemin, K. A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Animal Feed Science and Technology, 145: 209-228.

Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Ouellet, D.R., Chiquette, J. and Chouinard, P. Y. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. Journal of Dairy Science, 90: 886-97.

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

Bodkowski, R., Czyż, K., Sokoła-Wysoczańska, E., Janczak, M., Cholewińska, P., Wyrostek, A. 2020. The Effect of Low-Temperature Crystallization of Fish Oil on the Chemical Composition, Fatty Acid Profile, and Functional Properties of Cow's Milk. Animals 10, 1834.

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

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.

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

Carreño, D., Hervás, G., Toral, P. G., Belenguer, A. and Frutos, P. 2015. Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate *in vitro* ruminal biohydrogenation in sheep. Animal Feed Science and Technology, 202: 42-51.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martín-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

Dehority, B. A. 2003. Rumen microbiology, Nottingham University Press Nottingham. 372p.

Donovan, D., Schingoethe, D., Baer, R., Ryali, J., Hippen, A. and Franklin, S. 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, 83: 2620-2628.

Dorman, H. and Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88: 308-316.

Farsam, H., Amanlou, M., Radpour, M., Salehinia, A. and Shafiee, A. 2004. Composition of the essential oils of wild and cultivated Satureja khuzistanica Jamzad from Iran. Flavour and Fragrance Journal, 19: 308-310.

Fievez, V., Dohme, F., Danneels, M., Raes, K. and Demeyer, D. 2003. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and in vivo. Animal Feed Science and Technology, 104: 41-58.

Garcia, F., Colombatto, D., Brunetti, M. A., Martínez, M. J., Moreno, M. V., Scorcione Turcato, M., Lucini, E., Frossasco, G. and Martínez Ferrer, J. 2020. The reduction of methane production in the *in vitro* ruminal fermentation of different substrates is linked with the chemical composition of the essential oil. Animals, 10: 786.

Garcia, V., Catala-Gregori, P., Madrid, J., Hernandez, F., Megias, M. and Andrade-Montemayor, H. 2007. Potential of carvacrol to modify *in vitro* rumen fermentation as compared with monensin. Animal, 1: 675-680.

Gardinal, R., Calomeni, G., Zanferari, F., Vendramini, T., Takiya, C., Bertagnon, H., Batista, C., Della Libera, A. and Renno, F. 2018a. Different durations of whole raw soybean supplementation during the prepartum period: Measures of cellular immune function in transition cows. Journal of Dairy Science, 101: 661-674.

Gardinal, R., Calomeni, G., Zanferari, F., Vendramini, T., Takiya, C., Del Valle, T. and Renno, F. 2018b. Different durations of whole raw soybean supplementation during the prepartum period: Milk fatty acid profile and oocyte and embryo quality of early-lactating Holstein cows. Journal of Dairy Science, 101: 675-689.

Getachew, G., Makkar, H. P. and Becker, K. 2000. Tannins in tropical browses: effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48: 3581-3588.

Hadian, J., Hossein Mirjalili, M., Reza Kanani, M., Salehnia, A. and Ganjipoor, P. 2011. Phytochemical and morphological characterization of Satureja khuzistanica Jamzad populations from Iran. Chemistry and Biodiversity, 8: 902-915.

Hart, K., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S., McEwan, N. and Newbold, C. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology, 147: 8-35.

Hegarty, R. and Klieve, A. 1999. Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. Australian Journal of Agricultural Research, 50: 1315-1320.

Honan, M., Feng, X., Tricarico, J. M. and Kebreab, E. 2021. Feed additives as a strategic approach to reduce enteric methane production in cattle: modes of action, effectiveness and safety. Animal Production Science. Doi:10.1071/AN20295

Hristov, A. N., Ivan, M., Rode, L. M. and McAllister, T. A. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. Journal of Animal Science, 79: 515-524.

Hundal, J., Wadhwa, M. and Bakshi, M. 2019. Herbal feed additives containing essential oil: 1. Impact on the nutritional worth of complete feed *in vitro*. Tropical Animal Health and Production, 51: 1909-1917.

Kahvand, M. and Malecky, M. 2018. Dose-response effects of sage (*Salvia officinalis*) and yarrow (Achillea millefolium) essential oils on rumen fermentation *in vitro*. Annals of Animal Science, 18: 125-142.

Kholif, A. E. and Olafadehan, O. A. 2021. Essential oils and phytogenic feed additives in ruminant diet: chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. Phytochemistry Reviews, Doi:10.1007/s11101-021-09739-3.

Lovett, D., Lovell, S., Stack, L., Callan, J., Finlay, M., Conolly, J. and O'Mara, F. 2003. Effect of forage.concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. Livestock Production Science, 84: 135-146.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265–275.

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

Machmüller, A., Soliva, C. R. and Kreuzer, M. 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. Reproduction Nutrition Development, 43: 41-55.

Makkar, H., Blümmel, M. and Becker, K. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. British Journal of Nutrition, 73: 897-913.

Makkar, H., Sharma, O., Dawra, R. and Negi, S. 1982. Simple determination of microbial protein in rumen liquor. Journal of Dairy Science, 65: 2170-2173.

Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research, 49: 241-256.

Manso, T., Castro, T., Mantecón, A. and Jimeno, V. 2006. Effects of palm oil and calcium soaps of palm oil fatty acids in fattening diets on digestibility, performance and chemical body composition of lambs. Animal Feed Science and Technology, 127: 175-186.

Menke, K. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 28: 7-55.

Minson, D. J. 1997. Ruminants: the protein producers. Biologist, 44: 463-464.

Moss, A. R., Jouany, J.-P. and Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. pp. 231-253. In Annales de zootechnie, Vol. 49, EDP Sciences. Paris.

Nolan, J. and Dobos, R. 2005. Nitrogen transactions in ruminants. pp. 177–206. In J. Dijkstra, J.M. Forbes, J. France (eds). Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CABI Publishing: Wallingford, UK.

Onodera, R., Nakagawa, Y. and Kandtsu, M. 1977. Ureolytic activity of the washed cell suspension of rumen ciliate protozoa. Agricultural and Biological Chemistry, 41: 2177-2182.

Ottenstein, D. and Bartley, D. 1971. Separation of free acids C2–C5 in dilute aqueous solution column technology. Journal of Chromatographic Science, 9: 673-681.

Patel, S. and Ambalam, P. 2018. Role of rumen protozoa: metabolic and fibrolytic. Advances in Biotechnology and Microbiology, 10:79-83.

Purba, R. A. P., Paengkoum, P. and Yuangklang, C. 2019. *In vitro* ruminal fermentation and methane production of PUFA containing rations as treated by flavonoid and essential oil from Piper betle L. Chemistry. Doi: 10.20944/preprints201904.0156.v1

Reyes-Becerril, M., Gijón, D., Angulo, M., Vázquez-Martínez, J., López, M. G., Junco, E., Armenta, J., Guerra, K. and Angulo, C. 2021. Composition, antioxidant capacity, intestinal, and immunobiological effects of oregano (Lippia palmeri Watts) in goats: preliminary *in vitro* and in vivo studies. Tropical Animal Health and Production, 53: 101. Doi: 10.1007/s11250-020-02450-z.

Santos, N. W., Yoshimura, E. H., Mareze-Costa, C. E., Machado, E., Agustinho, B. C., Pereira, L. M., Brito, M. N., Brito, N. A., and Zeoula, L. M. 2017. Supplementation of cow milk naturally enriched in polyunsaturated fatty acids and polyphenols to growing rats. PloS one 12, Doi:10.1371/journal.pone.0172909.

Santra, A. and Karim, S. 2002. Influence of ciliate protozoa on biochemical changes and hydrolytic enzyme profile in the rumen ecosystem. Journal of Applied Microbiology, 92: 801-811.

Shingfield, K., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Ärölä, A., Nurmela, K., Huhtanen, P. and Griinari, J. M. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. Animal Science, 77: 165-179.

Shokryazdan, P., Rajion, M. A., Meng, G. Y., Boo, L. J., Ebrahimi, M., Royan, M., Sahebi, M., Azizi, P., Abiri, R. and Jahromi, M. F. 2017. Conjugated linoleic acid: a potent fatty acid

linked to animal and human health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57: 2737-2748.

Silva, S. N. S. E., Chabrillat, T., Kerros, S., Guillaume, S., Gandra, J. R., de Carvalho, G. G. P., Silva, F. F. D., Mesquita, L. G., Gordiano, L. A., Camargo, G. M. F., Ribeiro, C. V. D. M., de Araújo, M. L. G. M. L., Alba, H. D. R., Silva, R. D. G. and de Freitas, J. E., Jr. 2021. Effects of plant extract supplementations or monensin on nutrient intake, digestibility, ruminal fermentation and metabolism in dairy cows. Animal Feed Science and Technology, 275: 114886.

Sylvester, J., Karnati, S., Yu, Z., Newbold, C. J. and Firkins, J. 2005. Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. Journal of Dairy Science, 88: 2083-2095.

Takenaka, A., Tajima, K., Mitsumori, M. and Kajikawa, H. 2004. Fiber digestion by rumen ciliate protozoa. Microbes and Environments, 19: 203-210.

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. Animal Feed Science and Technology, 172: 115-124.

Torres, R. N. S., Moura, D. C., Ghedini, C. P., Ezequiel, J. M. B. and Almeida, M. T. C. 2020. Meta-analysis of the effects of essential oils on ruminal fermentation and performance of sheep. Small Ruminant Research, 189: 106148.

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

Wanapat, M., Kang, S., Khejornsart, P. and Wanapat, S. 2013. Effects of plant herb combination supplementation on rumen fermentation and nutrient digestibility in beef cattle. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 26: 1127-1136.

Williams, A.G., Coleman, G.S., 1992. Role of protozoa in the rumen, The Rumen Protozoa, Springer, pp. 317-347.

Zhou, R., Wu, J., Lang, X., Liu, L., Casper, D. P., Wang, C., Zhang, L. and Wei, S. 2020. Effects of oregano essential oil on *in vitro* ruminal fermentation, methane production, and ruminal microbial community. Journal of Dairy Science, 103: 2303-2314.