

**Effects of different levels of *Spearmint* (*Mentha spicata*) essential oil and methanolic extract on rumen fermentation parameters and methane production of dairy cattle *in vitro***

**Ehsan Rezaei<sup>1</sup>, Mostafa Malecky<sup>2\*</sup>, Daryoush Alipour<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> PhD student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Article Info	ABSTRACT
<b>Article type:</b> Research Full Paper	<b>Background and Objectives:</b> Given the escalating global population and its growing demand for animal protein resources, the significance of maximizing livestock production efficiency has doubled. Owing the low efficiency of rumen fermentation, the rumen manipulation has emerged as an effective strategy to improve feed efficiency and reduce nutrient wastage, thereby reducing environmental impact. In this context, the use of feed additives, particularly plant-derived secondary metabolites has attracted the attention of animal nutritionists as an effective strategy and sustainable solution in recent decades. Therefore, this study aimed to investigate <i>in vitro</i> the comparative effects of different levels of essential oil and extract of <i>spearmint</i> on gas volume production, rumen digestion parameters, and methane production.
<b>Article history:</b> Received: Revised: Accepted:	<b>Materials and Methods:</b> The essential oil of <i>spearmint</i> (MSEO) was extracted by steam distillation method using a Clevenger apparatus, and its extract (MSEX) was obtained using 85% methanol followed by ultrasonic bath and centrifugation. In this study, the effects of <i>spearmint</i> essential oil and extract on rumen digestion and fermentation parameters of a high-concentrate diet for dairy cows were evaluated at six concentration levels: zero (as control), 150 (low dose), 300 and 450 (moderate doses), and 600 mg/L (high dose) and the treatment effects were analysed statistically using a complete randomised design with combined analysis.
<b>Keywords:</b> Essential oil methanolic extract <i>spearmint</i> ( <i>mentha spicata</i> ) rumen fermentation methane gas	<b>Results:</b> The volume of gas produced after 24 h of incubation changed quadratically ( $P < 0.01$ ), and the percentage of methane production decreased linearly and non-linearly (linear and quadratic) with increasing dose of MSEO and MSEX, respectively ( $P < 0.01$ ), as the high dose of MSEO and MSEX resulted in an 8.2% and 12.7% reduction in the percentage of methane production, respectively, compared to the control ( $P < 0.01$ ). The true <i>in vitro</i> dry matter and organic matter digestibility of the substrate decreased linearly with increasing dose of both MSEO and MSEX ( $P < 0.01$ ). The microbial mass (MB) and efficiency of microbial biomass synthesis (EMBS) were affected only by MSEX, and increased non-linearly and linearly, respectively, with increasing dose of MSEX ( $P < 0.01$ ), with the highest MB and EMBS (16.7% and 25.3% increase, respectively, compared to the control) observed at 450 and 600 mg/L of MSEX, respectively ( $P < 0.01$ ). Ammonia concentration increased and decreased linearly with increasing dose of the essential oil and extract of <i>spearmint</i> , respectively ( $P < 0.05$ ). As at the high dose, MSEO increased ammonia by 46.5% while MSEX decreased ammonia by 13.6% compared to the control ( $P < 0.05$ ). Total volatile fatty acid concentration decreased linearly with both MSEO and MSEX dosages ( $P < 0.01$ ). The molar

---

---

proportion of propionate increased non-linearly with both MSEO and MSEX dosages ( $P < 0.01$ ), as the 150 mg/L level of MSEO and that of 600 mg/L of MSEX increased the proportion of propionate by 6.4% and 7.6% respectively compared to the control ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** In conclusion, the results of this study showed that despite the negative effects of both MSEO and MSEX at high doses on rumen fermentation, the use of *spearmint* dry extract at low and moderate doses (equivalent to fairly 150 to 450 g/d for dairy cattles) could have promising effects in improving rumen fermentation. The reduction in methane and ammonia production, and the improvement in microbial biomass and microbial biomass synthesis efficiency are indications of the beneficial effects of *spearmint* extract on rumen fermentation, which, in addition to improving production efficiency, may contribute to mitigating the environmental impact of ruminants, which requires further *in vivo* research under field conditions.

---

**Cite this article:** Rezaei, E., Malecky, M., Alipour, D. (2024). Effects of different levels of Spearmint (*Mentha spicata*) essential oil and methanolic extract on rumen fermentation parameters and methane production of dairy cattle *in vitro*. *Journal of Ruminant Research*, 12(4),.



© The Author(s).

DOI:

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

---

---

## اثرات سطوح مختلف روغن اسانس و عصاره متانولی گیاه نعناع دشتی (*Mentha spicata*) بر فرانسجه‌های تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه ای گاوهای شیری در شرایط آزمایشگاهی

احسان رضایی<sup>۱</sup>، مصطفی ملکی<sup>۲\*</sup>، داریوش علی‌پور<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، رایانامه: mmalecky@basu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی - پژوهشی	<b>سابقه و هدف:</b> نظر به افزایش روز افزون جمعیت و نیاز آن به منابع پروتئینی حیوانی، اهمیت افزایش بهره‌وری تولید دام‌ها دو چندان شده است. با توجه به کارایی پایین تخمیر شکمبه، دستکاری تخمیر شکمبه بعنوان یکی از راهکارهای مؤثر در جهت بهبود راندمان استفاده از خوراک و کاهش هدرروی مواد مغذی و جلوگیری از آلودگی محیط زیست مطرح شده است. در این راستا، استفاده از افزودنی‌های خوراکی، به خصوص متابولیت‌های ثانویه با منشأ گیاهی بعنوان راهکاری مؤثر و سازگار با دامپروری پایدار در دهه‌های اخیر مورد توجه محققین تغذیه دام قرار گرفته است. لذا، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات مقایسه‌ای سطوح مختلف روغن اسانس و عصاره گیاه نعناع دشتی بر حجم گاز تولیدی، فرانسجه‌های هضم و تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی بود.
تاریخ دریافت: تاریخ ویرایش: تاریخ پذیرش:	<b>مواد و روش‌ها:</b> روغن اسانس نعناع دشتی با استفاده از کلونجر به روش تقطیر با بخار آب و عصاره آن با استفاده از متانول ۸۵٪ و حمام اولتراسونیک و متعاقباً سانتریفیوژ استخراج گردید. در این تحقیق، اثرات روغن اسانس و عصاره گیاه نعناع دشتی در ۶ سطح غلظتی، شامل سطوح صفر (به عنوان شاهد) و سطوح ۱۵۰ (دوز پایین)، ۳۰۰ و ۴۵۰ (دوزهای متوسط)، و ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (دوز بالا) بر فرانسجه‌های هضم و تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه‌ای با یک جیره پر کنسانتره برای گاوهای شیری بررسی گردیده و اثرات تیمارها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی بصورت تجزیه مرکب مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.
واژه‌های کلیدی:	<b>یافته‌ها:</b> بموازات افزایش دوز اسانس و عصاره نعناع، حجم گاز تولید شده بعد از ۲۴ ساعت بصورت درجه دوم تغییر کرد ( $P < 0/01$ ) و درصد متان تولیدی بترتیب بصورت خطی و غیرخطی (خطی و درجه دوم) کاهش یافت ( $P < 0/01$ )، به طوری که استفاده از سطوح بالای اسانس و عصاره بترتیب موجب کاهش ۸/۲ و ۱۲/۷ درصد متان تولیدی در مقایسه با شاهد گردید ( $P < 0/01$ ). میزان هضم حقیقی ماده خشک و ماده آلی سوبسترا بترتیب بموازات افزایش دوز اسانس و عصاره نعناع بصورت خطی کاهش یافتند ( $P < 0/01$ ). توده میکروبی و بازده سنتز توده میکروبی تنها تحت تاثیر عصاره نعناع قرار گرفته و با افزایش دوز عصاره بترتیب بصورت

غیر خطی و خطی افزایش یافتند ( $P < 0/01$ )، بالاترین مقدار توده میکروبی و بازده سنتز توده میکروبی بترتیب با ۱۶/۷ و ۲۵/۳ درصد افزایش نسبت به شاهد بترتیب در سطوح ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره مشاهده گردید ( $P < 0/01$ ). غلظت آمونیاک شکمبه ای بموازات افزایش دوز اسانس و عصاره نعناع بترتیب بصورت خطی افزایش و کاهش یافت ( $P < 0/05$ )، به طوری که سطح بالای اسانس موجب افزایش ۴۶/۵ درصدی و سطح بالای عصاره موجب کاهش ۱۳/۶ درصدی غلظت آمونیاک درمقایسه با شاهد شدند ( $P < 0/05$ ). غلظت کل اسیدهای چرب فرار تحت تاثیر هر دو افزودنی اسانس و عصاره نعناع بصورت خطی کاهش یافت ( $P < 0/01$ ). درصد مولی پروپیونات با افزایش دوز اسانس و عصاره نعناع بصورت غیر خطی افزایش یافت ( $P < 0/01$ )، به طوری سطح ۱۵۰ اسانس و سطح ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره بترتیب موجب افزایش ۶/۴ و ۷/۶ درصدی پروپیونات نسبت به شاهد گردیدند ( $P < 0/01$ ).

**نتیجه گیری:** در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که با وجود اثرات منفی هر دو افزودنی اسانس و عصاره بر تخمیر شکمبه در دوز بالا، استفاده از عصاره خشک نعناع در دوزهای پایین و متوسط (معادل حدود ۱۵۰ تا ۴۵۰ گرم در روز برای گاوهای شیری) می تواند اثرات امید بخشی در بهبود تخمیر شکمبه داشته باشد. کاهش تولید گاز متان و آمونیاک، و بهبود تولید و بازده سنتز توده میکروبی حاکی از اثرات مثبت عصاره نعناع بر تخمیر شکمبه می باشند که ضمن بهبود راندمان تولید می تواند موجب کاهش اثرات زیست محیطی نشخوارکنندگان گردد که این امر نیازمند تحقیق بیشتر در شرایط مزرعه ای و با استفاده از دام زنده می باشد.

استناد: رضایی، احسان؛ ملکی، مصطفی؛ علی پور، داریوش. (۱۴۰۳). اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی و عصاره متانولی گیاه نعناع دشتی (*Mentha spicata*) بر فرانسجه های تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه ای گاوهای شیری در شرایط آزمایشگاهی. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۲(۴)،

DOI:



© نویسندهگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

### مقدمه

افزایش روز افزون تقاضا برای فرآورده‌های دامی و محدودیت منابع در دسترس جهت تغذیه دام‌ها موجب ایجاد چالش‌های جدی در زمینه تامین نیازهای غذایی دام‌ها شده که این موضوع لزوم افزایش بهره‌وری تولید دام‌ها جهت تامین نیاز پروتئین جوامع انسانی را دو چندان کرده است. در این میان، نقش نشخوارکنندگان بدلیل داشتن یک جمعیت میکروبی همزیست در شکمبه و نگاری و امکان استفاده از ترکیبات لیگنوسلولزی غیر قابل استفاده برای سایر دام‌های مزرعه‌ای، بسیار پر رنگ‌تر از تک معده‌ای‌ها است (Schader و همکاران، ۲۰۱۵). با وجود نقش محوری اکوسیستم میکروبی شکمبه در هضم فیبر علوفه‌ها (Van Soest و همکاران، ۱۹۹۱)، تخمیر میکروبی شکمبه اغلب منجر به هدررفت بخشی از مواد مغذی جیره بصورت گاز متان و آمونیاک می‌گردد که این موضوع منجر به کاهش راندمان استفاده از خوراک و همچنین آلودگی محیط زیست می‌گردد (Hussain و همکاران، ۲۰۱۰؛ Hristov و همکاران، ۲۰۱۵؛ Calabrò، ۲۰۱۵). از این رو، دستکاری تخمیر شکمبه بواسطه تغییر در جمعیت‌های میکروبی بعنوان یکی از راهکارهای مؤثر در جهت بهبود راندمان استفاده از خوراک و کاهش هدرروی مواد مغذی مطرح شده است (Adesogan، ۲۰۰۹؛ Bodas و همکاران، ۲۰۱۲؛ Wencelová و همکاران، ۲۰۱۵؛ Sanjorjo و همکاران، ۲۰۲۳). در این راستا، استفاده از افزودنی‌های خوراکی، به خصوص متابولیت‌های ثانویه با منشاء گیاهی اثرات امید بخشی در بهبود تخمیر شکمبه و کاهش هدررفت مواد مغذی جیره داشته است (Calsamiglia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kahvand و Malecky، ۲۰۱۸؛ Golbotteh و همکاران، ۲۰۲۲؛ Orzuna-Orzuna و همکاران، ۲۰۲۲؛ Zhao و همکاران، ۲۰۲۳؛ Szulc و همکاران، ۲۰۲۴). نظر به

مضرات استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در جیره دام‌ها که منجر به مقاومت میکروبی در انسان می‌گردد و لذا ممنوعیت استفاده از آن‌ها در تغذیه دام، و همچنین توجه روزافزون جامعه مصرف به فرآورده‌های ارگانیک، اهمیت استفاده از افزودنی‌های گیاهی در تغذیه دام را دو چندان نموده است (Kim و همکاران، ۲۰۱۹؛ Garcia-Galicia و همکاران، ۲۰۲۰؛ Dey و همکاران، ۲۰۲۱). اثرات مثبت متابولیت‌های ثانویه گیاهی (عمدتاً مشتمل بر اسانس‌ها و عصاره‌ها) در بهبود تخمیر شکمبه به اثرات ضد میکروبی انتخابی آن‌ها در مقابل انواع میکروارگانیسم‌های شکمبه شامل باکتری‌ها، پروتوزوآها و قارچ‌ها مربوط می‌شود (Giordani و همکاران، ۲۰۰۴؛ Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۱؛ Faniyi و همکاران، ۲۰۲۱). گیاه نعناع دشتی (*Mentha spicata*) یکی از گیاهان چند ساله معطر متعلق به خانواده *Lamiaceae* می‌باشد که به صورت تجاری در سراسر جهان کشت می‌شود. مطالعات انجام شده روی عصاره‌های خام، اسانس یا ترکیبات خالص جدا شده از این گیاه که عمدتاً شامل اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و لیگنان‌هاست اثرات بیولوژیک متعددی همچون اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی، ضد دیابت، ضد التهابی، فعالیت لاروکشی، و ضد آندروژنی نشان داده است (Hussain و همکاران، ۲۰۱۰؛ Snoussi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Bardaweel و همکاران، ۲۰۱۸؛ Mahendran و همکاران، ۲۰۲۱). گیاه نعناع حاوی ۱/۲ تا ۱/۵ درصد براساس ماده خشک اسانس بوده که ترکیبات غالب آن عمدتاً شامل منتول (۵۹ درصد) و منتون (۱۹ درصد) است (Sada و همکاران، ۲۰۰۳). با این وجود، ترکیبات غالب اسانس بسته به گونه مورد نظر می‌تواند متفاوت باشد، بطوریکه در گیاه نعناع دشتی ترکیبات غالب آن کارون (۴۰ تا ۵۲ درصد) و لیمونن (۱۴ تا ۲۰ درصد) می‌باشند (Hussain و همکاران، ۲۰۱۰؛ Snoussi و همکاران، ۲۰۱۵؛

Bardaweel و همکاران، ۲۰۱۸). مطالعات پیشین انجام شده روی گیاه نعناع در تلیسه‌ها (بمیزان ۲۰۰ گرم در روز) و روغن اسانس‌ی آن در شرایط آزمایشگاهی (۲۵۰-۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) حاکی از اثرات مثبت آن بر تخمیر شکمبه بواسطه کاهش غلظت آمونیاک شکمبه و جمعیت پروتوزوایی بدون تأثیر سوء بر هضم شکمبه‌ای خوراک بوده است (Ando و همکاران، ۲۰۰۳؛ Sada و همکاران، ۲۰۰۳؛ Taghavi-Nezhad و همکاران، ۲۰۱۳). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که استفاده از گیاه نعناع بمیزان ۵ درصد جیره در گاوهای هلشتاین بدون داشتن اثرات منفی بر تخمیر شکمبه و عملکرد دام، منجر به کاهش متان تولیدی گردید (Hosoda و همکاران، ۲۰۰۵). با توجه به ترکیب متفاوت ترکیبات مؤثره موجود در اسانس و عصاره گیاهان دارویی، استفاده از اسانس و عصاره یک گیاه بعنوان افزودنی جیره، اثرات متفاوتی بر تخمیر شکمبه می‌تواند داشته باشد. نظر به اثرات مثبت گیاه نعناع دشتی در معدود تحقیقات انجام شده بر بهبود تخمیر شکمبه و عدم وجود اطلاعات جامع در رابطه با اثرات اسانس و عصاره آن بر تخمیر شکمبه، آزمایش حاضر به منظور بررسی اثرات مقایسه‌ای سطوح مختلف اسانس و عصاره گیاه نعناع دشتی در جیره، بر حجم گاز تولیدی، فراسنجه‌های هضم و تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی نعناع دشتی و استخراج روغن اسانس و عصاره متانولی: نمونه‌های گیاهی نعناع دشتی در اوایل مرحله گلدهی پس از تهیه از مرکز تحقیقات استان کرمانشاه باهم مخلوط گردیدند تا یک نمونه معرف به دست آید. سپس نمونه معرف تا رسیدن به یک وزن ثابت در سایه خشک گردید و برای استخراج اسانس و عصاره متانولی در کیسه‌های پلاستیکی در بسته نگهداری شد. روغن اسانس نعناع

دشتی<sup>۱</sup> به روش تقطیر با بخارآب و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج گردید. جهت استخراج عصاره متانولی نعناع دشتی<sup>۲</sup>، نمونه معرف گیاهی ابتدا آسیاب شده، سپس توسط الک ۱ میلی متری غربال گردید. در مرحله بعد مقدار ۵ گرم نمونه الک شده در متانول ۸۵٪ به نسبت ۱:۵ (وزنی/حجمی) حل و به مدت ۲۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت، سپس با سرعت 8000xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و عصاره مواد گیاهی باقی مانده مجدداً با همان حجم استخراج گردید. مایع استخراج شده رویی دو مرحله استخراج جمع‌آوری و باهم ترکیب شده و سپس توسط روتاری تغلیظ گردید و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Skendi و همکاران، ۲۰۱۷).

تیمارها و انکوباسیون‌ها: در تحقیق حاضر روغن اسانس و عصاره گیاه نعناع دشتی در ۶ سطح غلظتی، شامل سطوح صفر (به‌عنوان شاهد) و سطوح ۱۵۰ (دوز پایین)، ۳۰۰ و ۴۵۰ (دوزهای متوسط)، و ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (دوز بالا) مورد مطالعه قرار گرفتند. انکوباسیون نمونه‌ها بمدت ۲۴ ساعته در ۳ تکرار برای هر سطح تیماری انجام شد و تولید گاز ۲۴ ساعته، هضم سویسترا، شاخص‌های تخمیر و تولید متان اندازه‌گیری شد. همه انکوباسیون‌ها در سه 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 ۱۰ رأس گاو کشتار شده در کشتارگاه جمع‌آوری گردیده و پس 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

1. Mentha spicata essential oil (MSEO)

2. Mentha spicata extract (MSEX)

سرنگ‌ها، گاز تولیدی در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون اندازه‌گیری شده و پس از تخلیه، حجم گاز جمع‌شده محاسبه گردید. در پایان انکوباسیون، تمامی محتویات سرنگ‌ها به لوله‌های فالکون منتقل شده و بلافاصله در آب یخ خنک شد تا تخمیر متوقف شود.

سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از فیلتراسیون با کاغذ صافی واتمن، نمونه‌های ۴ میلی‌لیتری از مایع شکمبه فیلتر شده با یک میلی‌لیتر اسید ارتوفسفریک ۲۵ درصد مخلوط شده و جهت تعیین محتوی اسیدهای چرب فرار در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

شروع آزمایش نگهداری شد. سوسترای تخمیر در این آزمایش یک جیره غذایی برای گاوهای شیرده در اوایل شیردهی بود (جدول ۱).

جهت انکوباسیون نمونه‌ها، مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از سوسترای تخمیر به همراه ۳۹/۸ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری شده و ۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی سطوح مختلف اسانس یا عصاره گیاه نعناع دشتی به مدت ۲۴ ساعت به صورت بی‌هوازی در سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری در ۳ تکرار انکوبه گردید (Makkar و همکاران، ۱۹۹۵). مایع شکمبه بافری شده با مخلوط نمودن مایع شکمبه و بافر (جدول ۲) به نسبت ۱:۲ (حجمی-حجمی) تهیه شد. همچنین تعداد سه سرنگ حاوی مایع شکمبه بافری شده بدون سوسترای عنوان بلانک استفاده شد. با توجه به محدودیت حجم

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی سوسترای تخمیر (براساس ماده خشک)

Table 1. The Ingredients and chemical composition of fermentation substrate (DM basis)

درصد در جیره (%)	Ingredients	اجزای خوراکی
20	Alfalfa hay	علف یونجه
20	Corn Silage	سیلاژ ذرت
22	Barley grain	دانه جو
11	Corn grain	دانه ذرت
3	Wheat bran	سوس گندم
8	Soybean, Meal	کنجاله سویا
4	Canola meal	کنجاله کانولا
2	Corn gluten meal	گلوتن ذرت
7.6	Linseed	دانه کنان
0.7	Sodium bicarbonate	بی‌کربنات سدیم
0.46	Salt	نمک
0.74	Vitamin and mineral premix	مکمل ویتامینه و معدن <sup>۱</sup>
0.5	Calcium Carbonate	کربنات کلسیم
	Chemical composition	ترکیب شیمیایی
16.5	Crude protein	پروتئین خام
33	NDF	الیاف نامحلول در شوینده خشی
2.60	Metabolizable Energy (Mcal/Kg)	انرژی متابولیسمی (مگا کالری بر کیلوگرم)

<sup>۱</sup> حاوی ویتامین A (۱۳۰۰ کیلو واحد بین المللی بر کیلوگرم)، ویتامین D (۲۶۰ کیلو واحد بین المللی بر کیلوگرم)، ویتامین E (۱۰۰۰۰ واحد بین المللی بر کیلوگرم)، کلسیم (۱۵۰ گرم بر کیلوگرم)، منیزیم (۳۰ گرم بر کیلوگرم)، منگنز (۱۵۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، کبالت (۳۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، مس (۳۷۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ید (۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، روی (۱۵۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، سلنیوم (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، آهن (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

1- Contains 1300 KIU of Vitamin A; 260 KIU of Vitamin D3 and 10000 IU of Vitamin E and 150 g Ca, 30 g Mg, 1500mg Mn, 34 mg Co, 3700 mg Cu, 180 mg I, 15000 mg Zn, 100 mg Se and 1000 mg Fe per Kg.

جدول ۲- ترکیب بافر استفاده شده برای محیط کشت

Table 2. The composition of the buffer used for inoculum

اجزای بافر	Ingredients	(میلی لیتر در لیتر)	ml.L
محلول معدنی ماکرو <sup>۱</sup>	Macro-minerals solution	237	237
محلول معدنی میکرو <sup>۲</sup>	Micro-minerals solution	0.12	0.12
محلول بافر بی کربنات <sup>۳</sup>	Bicarbonate buffer solution	237	237
محلول رزازورین <sup>۴</sup>	Resazurin solution	1.22	1.22
محلول احیاکننده <sup>۵</sup>	Reducing solution	50	50
آب مقطر	Distilled water	474.7	474.7

۱- حاوی ۵/۷ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات، ۶/۲ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۶ گرم سولفات منیزیم در لیتر

1. Contains 5.7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O per liter.

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

2. Contains 13.2 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10.0 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.0 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 8.0 g FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O and made up to 100 ml per liter.

۳- حاوی ۳۵ گرم بی کربنات سدیم و ۴ گرم کربنات آمونیوم در ۱ لیتر

3. Contains 35 g NaHCO<sub>3</sub> and 4 g NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> added up to 1,000 ml per liter.

۴- حاوی ۵۰ گرم رزازورین در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر

4. Contains 0.5 g resazurin in 100 ml distilled water.

۵- حاوی ۹۵ میلی لیتر آب مقطر، ۴ میلی لیتر سود ۱ نرمال و ۶۲۵ میلی گرم دی سدیم سولفید

5. Contains 95 ml H<sub>2</sub>O, 4 ml 1 N-NaOH and 625 mg Na<sub>2</sub>S<sub>9</sub>H<sub>2</sub>O

فاکتور تفکیک (Blummel و همکاران، ۱۹۹۷ a)، و

همچنین نمونه‌هایی با حجم ۴ میلی لیتر از مایع

اختلاف وزنی (بر اساس ماده خشک) بین بقایای

شکمبه فیلتر شده با حجم مساوی اسیدکلریدریک ۰/۲

هضم نشده سوبسترا در انتهای انکوباسیون و مقدار

نرمال تثبیت و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای

باقیمانده بعد از شستشو در محلول شوینده خنثی

آنالیز محتوی آمونیاک شکمبه‌ای ذخیره شد. باقیمانده

به‌عنوان زیست‌توده میکروبی در نظر گرفته شد

هضم نشده سوبسترا در لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت در

(Blummel و همکاران، ۱۹۹۷ b). همچنین نسبت

دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شده و وزن آن‌ها

توده میکروبی<sup>۳</sup> (میلی گرم) تولید شده بر ماده آلی

تعیین گردید. سپس بقایای خشک شده به مدت ۱

هضم شده (میلی گرم) بعنوان راندمان سنتز توده

ساعت در محلول شوینده خنثی جوشانده شده و با

میکروبی<sup>۴</sup> در نظر گرفته شد.

استفاده از پارچه پلی استر (با قطر منافذ ۴۰ میکرومتر)

اندازه‌گیری گاز متان: به‌منظور تعیین غلظت متان در

صاف و دوباره به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه

حجم گاز تولیدی در سرنگ‌ها، گاز تولیدی در طی

ساعتی گراد خشک شده و میزان هضم آزمایشگاهی ماده

۲۴ ساعت انکوباسیون در بطری‌های در بسته ضد گاز

خشک<sup>۱</sup> سوبسترا تعیین گردید. میزان هضم

جمع آوری گردید و در نهایت نمونه‌های ۱ میلی

آزمایشگاهی ماده آلی<sup>۲</sup> نیز پس از اندازه‌گیری

لیتری از گاز معرف ۲۴ ساعت به دستگاه

محتوی خاکستر بقایای خشک حاصله از مرحله قبل

کروماتوگراف گازی تزریق گردید. برای این منظور از

برآورد گردید. در این آزمایش، نسبت ماده آلی هضم

دستگاه کروماتوگراف گازی<sup>۵</sup> مجهز به آشکارساز

شده حقیقی (میلی گرم) به حجم گاز تولیدی

(میلی لیتر) بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون به‌عنوان

3- Microbial Biomass

4-Efficiency of Microbial Biomass Synthesis

5-GC-TCD, USA, HP 5890 Series, Agilent Technologies

1- *In vitro* true dry matter degradability (IVTDM)

2- *In vitro* true organic matter degradability (IVTOM)



آنالیز آماری: تمامی انکوباسیون‌ها در سه روز مختلف تکرار گردید و داده‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۵ سطح (سطوح مختلف اسانس یا عصاره نعناع) و به صورت تجزیه مرکب به کمک رویه MIXED نرم افزار SAS و با استفاده از مدل زیر مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت:

$$Yijkl = \mu + Ai + Dj + Ai \times Dj + e(ij)k$$

که در آن

$\mu$ : میانگین،  $Ai$ : اثر تیمار،  $Dj$ : اثر روز،  $e(ij)k$ : اثر خطا می‌باشند که در مدل استفاده شده، تیمارها (شامل دوزهای مختلف اسانس و عصاره نعناع) به عنوان اثر ثابت، و روز، تیمار  $\times$  روز و تکرار نست شده در روز بعنوان اثرات تصادفی در نظر گرفته شدند. برای ارزیابی روند پاسخ (خطی و درجه دو) متغیرهای مختلف به سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع از مقایسه‌های اورتوگونال استفاده شد. در صورت معنی دار بودن اثر تیمارها، حداقل مربعات میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی کرامر در سطح معنی داری ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین سطح احتمال بین ۵ و ۱۰ درصد محدودده تمایل به معنی داری در نظر گرفته شد.

### نتایج و بحث

اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر تولید گاز کل و گاز متان: داده‌های مربوط به اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر تولید گاز ۲۴ ساعته و متان در جدول ۳ ارائه شده است. براساس نتایج جدول ۳، حجم گاز کل تولیدی<sup>۶</sup> با افزایش دوز هردو افزودنی (اسانس و عصاره) بصورت درجه دو تغییر یافت ( $P < 0/05$ ). با اینحال مولفه مذکور تنها در سطوح مختلف عصاره نعناع دشتی تحت تاثیر تیمار قرار گرفت ( $P < 0/01$ ).

هدایت حرارتی<sup>۱</sup> و ستون پر شده استیل<sup>۲</sup> استفاده شد. هلیوم به عنوان گاز حامل با نرخ دبی ثابت ۲۰ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. همچنین دمای ستون در ۶۰ درجه سانتیگراد و دمای آشکار ساز در ۲۴۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. جهت شناسایی و تعیین غلظت گاز متان و دی اکسید کربن از گازهای خالص مربوطه بعنوان استاندارد استفاده گردید.

آنالیزهای شیمیایی: تمامی آزمایشات مربوط به آنالیز شیمیایی خوراک در آزمایشگاه تغذیه دام وابسته به دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام گردید. محتوی ماده خشک و ماده آلی نمونه‌ها مطابق با روش‌های انجمن رسمی شیمی دانان کشاورزی<sup>۳</sup> اندازه‌گیری شد (AOAC, ۲۰۰۰). غلظت آمونیاک شکمبه‌ای با استفاده از روش فنل هیپوکلریت و به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید (Broderick و Kang, ۱۹۸۰). غلظت اسیدهای چرب فرار نمونه‌ها با استفاده از یک دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به یک آشکار ساز یونش شعله‌ای<sup>۴</sup> و یک ستون موئین<sup>۵</sup> (۵۰ متر  $\times$  ۰/۵۳ میلی متر، ضخامت فیلم = ۲ میکرومتر) اندازه‌گیری شد (Bartley و Ottenstein, ۱۹۷۱). از هیدروژن به عنوان گاز حامل با نرخ دبی ثابت ۳۰ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. دمای ستون در ابتدا در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد بمدت یک دقیقه نگهداری شد، سپس با نرخ ۳۰ درجه در دقیقه تا دمای ۲۳۰ درجه سانتیگراد افزایش یافت و در این دما بمدت ۵ دقیقه باقی ماند. دمای انژکتور (تزریق کننده) و آشکار ساز بترتیب در دمای ۲۲۰ و ۲۴۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید.

1. Thermal Conductivity Detector
2. Porapak-Q, 1.8 m  $\times$  2 mm i.d. 80/100 mesh size
3. Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000)
4. GC-FID, USA, HP 5890 Series, Agilent Technologies
5. CP-Wax 58 FFAP CB

6. Gas produced after 24 h of incubation (GP<sub>24</sub>)

بطوریکه حجم گاز تولیدی در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره بالاترین مقدار و در سطح ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پایین‌ترین مقدار را داشت. تغییرات حجم گاز دی‌اکسید کربن نیز تقریباً مشابه با گاز کل بود و تحت تاثیر عصاره بصورت درجه دو تغییر کرد ( $P < 0/05$ ). با اینحال، حجم گاز متان تولیدی فقط تحت تاثیر عصاره نعنای بصورت غیر خطی (خطی و درجه دو) کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). درصد دی‌اکسید کربن تحت تاثیر هیچکدام از افزودنی‌ها قرار نگرفت ( $P > 0/05$ ). با این وجود، درصد متان تولیدی، تحت تاثیر هر دو افزودنی (اسانس و عصاره) قرار گرفت، و بموازات افزایش دوز اسانس بصورت خطی ( $P < 0/01$ ) و تحت تاثیر عصاره بصورت غیر خطی ( $P < 0/01$ ) کاهش یافت. بر این اساس، درصد گاز متان تحت تاثیر اسانس و عصاره نعنای بترتیب بمیزان ۸/۲ و ۱۲/۷ درصد در بالاترین سطوح کاهش یافت. همچنین، نسبت متان به گاز کربنیک مشابه با درصد متان تولیدی تحت تاثیر هر دو افزودنی (اسانس و عصاره) قرار گرفت و با افزایش دوز اسانس بصورت خطی ( $P < 0/01$ ) و تحت تاثیر عصاره بصورت غیر خطی ( $P < 0/01$ ) کاهش یافت.

در آزمایش حاضر، کاهش میزان گاز تولیدی در سطح بالای عصاره نعنای دشتی با کاهش میزان هضم شکمبه‌ای ماده خشک و ماده آلی در این سطح همسو بود، و این می‌تواند در نتیجه اثرات مهاری این افزودنی بر فعالیت میکروبی شکمبه باشد (Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۱؛ Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۳؛ Bardaweel و همکاران، ۲۰۱۸). با این وجود، علیرغم کاهش هضم شکمبه‌ای ماده خشک و آلی در سطح بالا و تا حدودی در سطوح متوسط اسانس، عدم تغییر قابل توجه در گاز تولیدی می‌تواند در نتیجه تولید گاز از منشاء غیر سوبسترا

باشد. عدم همسویی گاز تولیدی با تولید کل اسیدهای چرب فرار نیز می‌تواند مؤید این احتمال باشد. در این راستا، تحقیقات گذشته نشان داده است که ترکیبات ثانویه گیاهی، از جمله ترکیبات روغن‌های اسانس می‌تواند موجب کاهش تولید اسیدهای شکمبه‌تجزیه‌شونده (Boudiscou و همکاران، ۲۰۰۲؛ Malecky و همکاران، ۲۰۱۲) و این می‌تواند منجر به تولید گاز بدون تولید اسیدهای چرب فرار گردد.

کاهش درصد متان تولیدی و نسبت متان تولیدی به دی‌اکسید کربن به موازات افزایش هر دو افزودنی (اسانس و عصاره) می‌تواند عمدتاً به دلیل اثرات مهاری مستقیم ترکیبات مؤثره موجود در نعنای به خصوص در بخش عصاره آن بر متانوژن‌ها و یا پروتوزوآها باشد. در این رابطه، در تحقیقات پیشین یک اثر ضد متانوژنیک قوی از ترکیبات مؤثره اسانس نعنای گزارش شده است (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۸؛ Delgadillo-Ruiz و همکاران، ۲۰۲۱). با این حال، بخشی از اثرات مهاری اسانس و عصاره نعنای بر تولید متان به خصوص در غلظت بالا می‌تواند بطور غیرمستقیم و در نتیجه محدودیت پیش سازهای آن برای متانوژن‌ها مانند دی‌اکسید کربن و دی‌هیدروژن باشد (Patra و Yu، ۲۰۱۲).

این امر با توجه به کاهش حجم دی‌اکسید کربن در سطح بالای اسانس و بخصوص عصاره نعنای دشتی تا حدی قابل تأیید است. در برخی از مطالعات گزارش شده است که گیاه نعنای بدلیل داشتن برخی از متابولیت‌های ثانویه مانند ال کارون، دی‌هیدروکارون، فلاندرن، منتول و منتون (Lawless و همکاران، ۱۹۹۵)، دارای اثرات ضد پروتوزوآیی و کاهش دهنده متانوژن‌هاست (Ando و همکاران، ۲۰۰۳؛ Agarwal و همکاران، ۲۰۰۸؛ Delgadillo-Ruiz و همکاران، ۲۰۲۱).

اثرات سطوح مختلف روغن اسانس و عصاره متانولی گیاه... / احسان رضایی و همکاران

جدول ۳- اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر تولید گاز ۲۴ ساعته و متان

Table 3. Effects of different doses of *Mentha spicata* essential oil (MSEO) and extract (MSEX) on 24-h *in vitro* gas and methane production

P-Value			SEM	MSEO (میلی گرم بر لیتر)					فرا سنج
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.045	0.934	0.152	4.41	105.9	119.3	114.7	113.5	109.1	تولید گاز ۲۴ ساعته GP <sub>24</sub>
0.191	0.253	0.387	0.74	15.4	17.7	17.3	17.0	17.2	تولید متان (میلی لیتر) CH <sub>4</sub> (ml.24h)
0.092	0.825	0.335	3.20	83.5	92.6	90.0	78.2	85.0	تولید دی اکسید کربن (میلی لیتر) CO <sub>2</sub> (ml.24h)
0.696	0.001	0.013	0.19	14.5 <sup>b</sup>	14.8 <sup>b</sup>	15.1 <sup>ab</sup>	15.3 <sup>ab</sup>	15.8 <sup>a</sup>	درصد متان CH <sub>4</sub> %
0.813	0.717	0.417	0.43	78.6	77.6	78.5	78.5	77.8	درصد دی اکسید کربن CO <sub>2</sub> %
0.826	0.006	0.054	0.003	0.18 <sup>b</sup>	0.19 <sup>ab</sup>	0.19 <sup>ab</sup>	0.19 <sup>ab</sup>	0.2 <sup>a</sup>	متان به دی اکسید کربن CO <sub>2</sub> : CH <sub>4</sub>
P-Value			SEM	MSEX (میلی گرم بر لیتر)					فرا سنج
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.002	0.391	0.017	4.11	97.1 <sup>b</sup>	107.9 <sup>ab</sup>	115.8 <sup>ab</sup>	106.7 <sup>ab</sup>	101.9 <sup>ab</sup>	تولید گاز ۲۴ ساعته GP <sub>24</sub>
0.019	0.002	0.007	0.48	13.0 <sup>b</sup>	14.9 <sup>ab</sup>	16.5 <sup>a</sup>	15.5 <sup>a</sup>	16.1 <sup>a</sup>	تولید متان (میلی لیتر) CH <sub>4</sub> (ml.24h)
0.003	0.220	0.023	2.67	73.3 <sup>b</sup>	83.3 <sup>ab</sup>	90.1 <sup>a</sup>	83.3 <sup>ab</sup>	79.5 <sup>ab</sup>	تولید دی اکسید کربن (میلی لیتر) CO <sub>2</sub> (ml.24h)
0.007	<0.001	<0.001	0.14	13.7 <sup>c</sup>	13.8 <sup>c</sup>	14.2 <sup>bc</sup>	14.6 <sup>b</sup>	15.7 <sup>a</sup>	درصد متان CH <sub>4</sub> %
0.353	0.907	0.456	0.42	77.3	77.3	77.3	78.1	78.0	درصد دی اکسید کربن CO <sub>2</sub> %
0.023	<0.001	<0.001	0.003	0.175 <sup>b</sup>	0.177 <sup>b</sup>	0.180 <sup>b</sup>	0.187 <sup>b</sup>	0.203 <sup>a</sup>	متان به دی اکسید کربن CO <sub>2</sub> : CH <sub>4</sub>

SEM: انحراف استاندارد میانگین ها، P-Value (تیمار = Tr، خطی = L، درجه دوم = Q)، و حروف بالا<sup>a,b</sup> در هر ردیف نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار در سطح خطای ۰/۰۵ می باشد.

SEM: standard error of the means, P-Values (Tr: treatment, L: linear, Q: quadratic), <sup>a,b</sup>: different superscript letters indicate differences (P<0.05) between the treatments.

Moss و همکاران، ۲۰۰۰؛ Khejornsart و همکاران،

۲۰۲۱؛ Golbotteh و همکاران، ۲۰۲۲).

اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی

بر شاخص های هضم و تخمیر شکمبه: نتایج مربوط

به اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی

بر شاخص های هضم و تخمیر شکمبه در جدول ۴

از این رو، همانطور که اشاره شد، در مطالعه

حاضر بخشی از کاهش تولید متان ممکن است با

کاهش نسبی جمعیت های پروتوزوای شکمبه که

زیستگاه طبیعی برخی از جمعیت های متانوزئیک

هستند و در تأمین دی هیدروژن به متانوزن ها نقش

دارند، مرتبط باشد (Klieve و Hegarty، ۱۹۹۹؛

آمده است. براساس نتایج جدول مذکور بموازات افزایش سطوح هر دو افزودنی اسانس و عصاره نعناع دشتی میزان هضم حقیقی ماده خشک و میزان هضم حقیقی ماده آلی سوبسترا بصورت خطی کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). با اینحال، فقط سطوح ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر اسانس و سطح بالای عصاره منجر به کاهش معنی دار هضم ماده خشک و آلی در مقایسه با شاهد گردید ( $P < 0/05$ ). با توجه به اینکه افزودنی های نعناع دشتی (اسانس و عصاره) حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنلی (کارون و لیمونن در بخش اسانس و ترکیبات فلاونوئیدی در بخش عصاره) می باشند (Hassan و همکاران، ۲۰۱۴؛ Snoussi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Bardaweel و همکاران، ۲۰۱۸)، لذا می توانند در سطوح بالا علیه طیف وسیعی از میکروارگانسیم ها بعنوان باز دارنده (اثرات ضد میکروبی غیر اختصاصی) عمل کنند، و از این طریق باعث کاهش فعالیت میکروارگانسیم های درگیر در هضم خوراک شوند. در این رابطه برخی از محققان نشان دادند که استفاده از گیاه نعناع در سطوح ۵ درصد در جیره های گاوهای هلشتاین منجر به کاهش قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی گردید (Hosoda و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین در مطالعه ای دیگری مشخص شد که استفاده از سطوح بالای روغن اسانس نعناع منجر به کاهش فرایند هضم و تخمیر می شود (Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۱). با توجه به این نتایج، به نظر می رسد که روغن اسانسی نعناع اثرات آنتی میکروبی قویتری نسبت به عصاره نعناع دارد و در سطوح ۴۵۰ میلی گرم بر لیتر و بالاتر موجب کاهش فعالیت عمومی میکروبی شکمبه می گردد که در مجموع موجب افت عملکرد شکمبه می گردد.

فاکتور تفکیک<sup>۱</sup> تنها تحت تاثیر عصاره نعناع دشتی قرار گرفت و به موازات افزایش دوز عصاره بصورت درجه دو تغییر کرد ( $P < 0/05$ ), با اینحال، اسانس نعناع نیز تمایل به تغییر این فاکتور به صورت خطی داشت. در واقع فاکتور تفکیک بیانگر نسبت توزیع ماده آلی هضم شده بین مسیرهای متابولیکی تخمیر (تولید اسیدهای چرب فرار و گاز) و مسیر تولید توده میکروبی می باشد (Blummel و همکاران، ۱۹۹۷ b)، با اینحال در محاسبه آن که از نسبت ماده آلی هضم شده به گاز تولید شده بدست می آید، میزان توده میکروبی و یا اسیدهای چرب فرار تولید شده لحاظ نشده و در صورت تولید گاز از منابع آلی غیر مغذی، این مؤلفه نمی تواند شاخص دقیقی از توزیع ماده آلی هضم شده در مسیرهای دوگانه متابولیکی یاد شده در شکمبه باشد. در آزمایش حاضر کاهش فاکتور تفکیک در سطوح متوسط اسانس و عصاره می تواند بدلیل افزایش گاز تولیدی در این سطوح باشد. در صورتی که روند تغییرات اسیدهای چرب فرار کل در هر دو افزودنی و همچنین پاسخ توده میکروبی به سطوح عصاره نعناع بصورت خطی می باشد، لذا در این شرایط می توان انتظار داشت که روند تغییرات توده میکروبی متفاوت از پاسخ فاکتور تفکیک باشد. در تحقیق حاضر، توده میکروبی و بازده سنتز توده میکروبی تنها تحت تاثیر افزودنی عصاره نعناع دشتی قرار گرفتند، با اینحال، راندمان سنتز توده میکروبی تحت تاثیر اسانس نعناع نیز بصورت خطی تمایل به افزایش داشت ( $P = 0/083$ ). در این رابطه، با افزایش غلظت عصاره، توده میکروبی و همچنین بازده سنتز توده میکروبی بصورت خطی افزایش یافته ( $P < 0/05$ ) و بالاترین مقدار توده میکروبی با افزایش ۱۶/۷ درصدی نسبت به شاهد در سطح ۴۵۰ و بالاترین بازده سنتز توده میکروبی با افزایش ۲۵/۳ درصدی

میکروبی (Santoso و همکاران، ۲۰۰۷؛ El-Zaiat و Abdalla، ۲۰۱۹) از طرف دیگر، می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از اثرات مثبت عصاره نعنای می‌تواند در نتیجه کاهش جمعیت پروتوزوایی شکمبه باشد. تحقیقات انجام شده در این زمینه حاکی از اثرات ضد پروتوزوایی تانن‌ها و فلاونوئید (ترکیبات غالب در عصاره نعنای) بر جمعیت پروتوزوایی شکمبه است (Patra و همکاران، ۲۰۰۶؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۳؛ El-Zaiat و همکاران، ۲۰۱۹). در مقابل، افزایش میزان غلظت نیتروژن آمونیاکی بموازات افزایش دوز اسانس، با وجود کاهش نسبی هضم ماده آلی در دوزهای متوسط می‌تواند ناشی از اثرات ضد میکروبی قویتر اسانس و لذا مهار رشد میکروبی و حتی لیز آن‌ها باشد. لازم به ذکر است غلظت آمونیاک در شکمبه حاصل تعادل بین تجزیه پروتئین جیره‌ای و لیز میکروب‌ها از یک طرف، و جذب آن توسط میکروب‌ها (در شرایط آزمایشگاهی) و جذب از دیواره شکمبه (در دام زنده) از طرف دیگر می‌باشد (Dobos و Nolan، ۲۰۰۵). لذا، افزایش غلظت شکمبه‌ای آمونیاک به موازات افزایش دوز اسانس با وجود کاهش نسبی هضم ماده آلی، نمی‌تواند در نتیجه افزایش تجزیه پروتئین جیره‌ای باشد. همانطور که قبلاً اشاره شد، بالاتر بودن اثر ضد میکروبی اسانس نعنای در مقایسه با عصاره آن می‌تواند منجر به لیز باکتری‌ها شده باشد که این می‌تواند یکی از دلایل افزایش آمونیاک شکمبه‌ای توسط اسانس در آزمایش حاضر باشد (Cleff و همکاران، ۲۰۱۵).

نسبت به شاهد در سطح ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مشاهده شد. همچنین، غلظت آمونیاک شکمبه‌ای نیز بطور متفاوتی تحت تاثیر اسانس و عصاره نعنای قرار گرفت، بطوریکه غلظت آن به موازات افزایش دوز اسانس بطور خطی افزایش ( $P < 0/01$ ) و با افزایش دوز عصاره بصورت خطی کاهش یافت ( $P < 0/01$ ). در این رابطه، سطح بالای اسانس موجب افزایش ۴۶/۵ درصدی آمونیاک و سطح بالای عصاره موجب کاهش ۱۳/۶ درصدی غلظت آمونیاک در مقایسه با شاهد شدند ( $P < 0/05$ ). اثرات کاملاً متفاوت اسانس و عصاره نعنای بر تولید توده میکروبی و همینطور غلظت آمونیاک شکمبه‌ای می‌تواند به ماهیت ترکیبات متفاوت موجود در این دو افزودنی نعنای دشتی مربوط باشد.

در این تحقیق، افزایش توده میکروبی و راندمان سنتز آن به‌هنگام استفاده از عصاره نعنای با تغییرات غلظت آمونیاک شکمبه‌ای همسو بود، لذا می‌توان ادعا داشت که افزایش راندمان سنتز توده میکروبی که مبین استفاده بهینه از نیتروژن در دسترس (غالباً به شکل آمونیاک) جهت سنتز پروتئین میکروبی می‌باشد (Jouany، ۱۹۹۶؛ Santoso و همکاران، ۲۰۰۷؛ Joch و همکاران، ۲۰۱۹)، منجر به کاهش غلظت آمونیاک شکمبه‌ای به‌هنگام استفاده از عصاره نعنای شده است. در نگاه کلی تر و با توجه به اثر پررنگ تر عصاره نعنای در مقایسه با اسانس آن در کاهش گاز متان از یک طرف و همچنین نقش مهم پروتوزوآها در تولید متان و آمونیاک (Bach و همکاران، ۲۰۰۵)، و همچنین ترن‌آور میکروبی و در نتیجه کاهش راندمان سنتز پروتئین

جدول ۴- اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه

Table 4. Effects of different doses of *Mentha spicata* essential oil (MSEO) and extract (MSEX) on rumen digestibility and fermentation

P-Value			SEM	MSEO (میلی‌گرم بر لیتر)					فرا سنج
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.840	0.001	0.007	1.03	77.2 <sup>b</sup>	78.4 <sup>b</sup>	81.3 <sup>ab</sup>	83.0 <sup>a</sup>	84.5 <sup>a</sup>	تجزیه پذیری حقیقی ماده خشک TIVDMD(%)
0.999	0.001	0.008	1.04	77.5 <sup>c</sup>	78.7 <sup>bc</sup>	81.4 <sup>abc</sup>	82.9 <sup>ab</sup>	84.8 <sup>a</sup>	تجزیه پذیری حقیقی ماده آلی TIVOMD(%)
0.057	0.071	0.089	0.15	3.64	3.31	3.57	3.69	3.89	فاکتور تفکیک PF
0.408	0.153	0.454	3.58	141.0	141.3	141.7	142.9	147.0	توده میکروبی MB(mg)
0.427	0.083	0.336	0.01	0.365	0.359	0.348	0.345	0.347	بازده سنتز توده میکروبی EMBS (mg)
0.490	0.003	0.020	0.74	14.5 <sup>a</sup>	12.1 <sup>ab</sup>	12.0 <sup>ab</sup>	11.3 <sup>ab</sup>	9.91 <sup>b</sup>	آمونیاک NH <sub>3</sub> (mmol L <sup>-1</sup> )

  

P-Value			SEM	MSEX (میلی‌گرم بر لیتر)					فرا سنج
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.720	0.001	0.008	1.14	77.8 <sup>b</sup>	79.6 <sup>ab</sup>	80.7 <sup>ab</sup>	82.4 <sup>a</sup>	84.3 <sup>a</sup>	تجزیه پذیری حقیقی ماده خشک TIVDMD(%)
0.736	0.001	0.009	1.22	77.6 <sup>b</sup>	79.6 <sup>ab</sup>	80.6 <sup>ab</sup>	82.5 <sup>a</sup>	83.4 <sup>a</sup>	تجزیه پذیری حقیقی ماده آلی TIVOMD(%)
0.002	0.265	0.015	0.14	4.02 <sup>a</sup>	3.70 <sup>ab</sup>	3.50 <sup>b</sup>	3.88 <sup>ab</sup>	4.13 <sup>a</sup>	فاکتور تفکیک PF
0.291	0.003	0.022	5.75	141.7 <sup>ab</sup>	144.11 <sup>a</sup>	138.4 <sup>ab</sup>	126.4 <sup>ab</sup>	123.5 <sup>b</sup>	توده میکروبی MB(mg)
0.520	0.001	0.012	0.02	0.366 <sup>b</sup>	0.363 <sup>b</sup>	0.344 <sup>ab</sup>	0.307 <sup>ab</sup>	0.292 <sup>b</sup>	بازده سنتز توده میکروبی EMBS (mg)
0.115	0.008	0.039	0.74	8.81 <sup>b</sup>	8.17 <sup>b</sup>	9.05 <sup>ab</sup>	9.34 <sup>ab</sup>	10.2 <sup>a</sup>	آمونیاک NH <sub>3</sub> (mmol L <sup>-1</sup> )

SEM: انحراف استاندارد میانگین‌ها، P-Value (تیمار=Tr، خطی=L، درجه دوم=Q) و حروف بالا<sup>a,b</sup> در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵ می‌باشد.

SEM: standard error of the means, P-Value (Tr: treatment, L: linear, Q: quadratic), <sup>a,b</sup>: different superscript letters indicate differences (P<0.05) between the treatments.

درصدی غلظت کل اسیدهای چرب فرار در مقایسه با شاهد گردید.

همچنین، پروفایل اسیدهای چرب فرار نیز تحت تاثیر اسانس و عصاره نعناع دشتی تغییر کرد. در این راستا، مهمترین تغییر مربوطه به افزایش درصد مولی پروپیونات بود که تحت تاثیر هر دو افزودنی به صورت غیر خطی افزایش یافت (P<۰/۰۵) و بالاترین درصد مولی آن با افزایش ۶/۴ درصدی نسبت به شاهد در سطح

اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع

دشتی بر غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه:

براساس نتایج جدول ۵، غلظت کل اسیدهای چرب فرار با افزایش سطح اسانس و عصاره نعناع دشتی بترتیب به صورت غیرخطی (خطی و درجه دوم) و خطی کاهش یافت (P<۰/۰۱)، بطوریکه سطح بالای هر دو افزودنی (۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بترتیب موجب کاهش ۲۰ و ۲۸

۲۰۱۷) که می تواند مؤید این امر باشد که تغییرات PH می تواند تخمیر شکمبه ای را به طور ثانویه تحت تاثیر قرار دهد.

در تحقیق حاضر، افزایش نسبت پروپیونات به استات به موازات افزایش دوز هر دو افزودنی اسانس و عصاره نعنای، بطور عمده ناشی از افزایش نسبت مولی پروپیونات بود. این امر حاکی از بهبود نسبی شرایط تخمیر شکمبه جهت افزایش تولید پروپیونات و میکروبی های تولید کننده این متابولیت می باشد. این نتایج با تغییرات درصد تولید متان نیز همسو می باشد که مبین شیفیت اکی والان های احیا از مسیر تولید متان به سمت تولید پروپیونات می باشد (Patra و Yu، ۲۰۱۳؛ Ungerfeld، ۲۰۱۵؛ Golbotteh و همکاران، ۲۰۲۲). علاوه بر این، افزایش نسبت مولی پروپیونات به خصوص در تیمارهای عصاره می تواند تا حدی ناشی از کاهش جمعیت پروتوزوآها باشد. در این راستا، مطالعات صورت گرفته نشان داده که کاهش جمعیت پروتوزوآیی می تواند موجب افزایش غلظت مولی پروپیونات و افزایش نسبت پروپیونات به استات گردد (Patra و همکاران، ۲۰۰۶؛ El-Zaiat و همکاران، ۲۰۱۹؛ Torres و همکاران، ۲۰۲۰).

غلظت اسیدهای چرب فرار شاخه دار عموماً با تجزیه پروتئین و دامیناسیون اسیدهای آمینه از یک طرف و جذب آنها توسط میکروبی های شکمبه برای سنتز پروتئین میکروبی در ارتباط است (Roman-Garcia و همکاران، ۲۰۱۶؛ Roman-Garcia و همکاران، ۲۰۲۱). در مطالعه حاضر، نظر به کاهش هضم ماده خشک و آلی، افزایش نسبت مولی ایزوبوتیرات به موازات افزایش اسانس می تواند در نتیجه کاهش برداشت میکروبی برای این اسید چرب باشد که این نتایج با افزایش غلظت آمونیاک و عدم تغییر در توده میکروبی علیرغم بهبود نسبی راندمان تولید میکروبی در این تیمارها همخوانی دارد.

۱۵۰ میلی گرم برلیتر اسانس، و با افزایش ۷/۶ درصدی نسبت به شاهد در سطح ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره مشاهده شد. بر همین اساس، نسبت استات به پروپیونات بصورت غیر خطی تحت تاثیر اسانس و عصاره نعنای کاهش یافت (P<۰/۰۵). همچنین، با افزایش دوز اسانس نعنای، درصد مولی بوتیرات به صورت خطی کاهش (P<۰/۰۱) و درصد مولی ایزو بوتیرات به صورت خطی افزایش (P<۰/۰۱) یافت. در این بین، درصد مولی ایزو والرات نیز تحت تاثیر اسانس به صورت غیر خطی تغییر کرد (P<۰/۰۵)، هر چند اثر تیمار بر آن معنی دار نبود.

در این تحقیق، با وجود همسویی تغییرات غلظت کل اسیدهای چرب فرار با تغییرات هضم ماده آلی در هر دو تیمار اسانس و عصاره، کاهش غلظت کل اسیدهای چرب فرار به خصوص با افزایش دوز عصاره نعنای با شیب بیشتری همراه بود. لذا، همانطور که قبلاً اشاره شد، به نظر می رسد که علاوه بر کاهش فعالیت میکروبی در دوز بالا و تا حدودی در دوزهای متوسط، تغییر مسیر توزیع مواد مغذی هضم شده به سمت تولید توده میکروبی، عامل مهم کاهش پر رنگتر غلظت کل اسیدهای چرب فرار در تیمارهای عصاره نعنای باشد. این نتایج با نتایج مربوط به توده میکروبی و راندمان سنتز توده میکروبی هم خوانی دارد. در این رابطه، برخی از مطالعات پیشین نشان داده اند که استفاده از اسانس نعنای و یا ترکیبات موثره (کارون) آن می تواند منجر به افزایش PH و کاهش اسیدهای چرب فرار گردد (Busquet و همکاران، ۲۰۰۶؛ Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۱)، در برخی دیگر از این تحقیقات مشخص شده که کاهش PH می تواند هم تجزیه پذیری و هم سنتز پروتئین میکروبی را کاهش دهد (Wenner و همکاران،

جدول ۵- اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر پروفایل اسیدهای چرب فرار شکمبه

Table 5. Effects of different doses of Mentha spicata essential oil (MSEO) and extract (MSEX) on rumen volatile fatty acid (VFA) profiles.

P-Value			SEM	MSEO (میلی گرم بر لیتر)				فرا سنجه	
Q	L	Tr		600	450	300	150		صفر
0.001	<0.001	<0.001	1.06	80.0 <sup>c</sup>	83.5 <sup>c</sup>	83.6 <sup>c</sup>	89.4 <sup>b</sup>	100.3 <sup>a</sup>	کل اسیدهای چرب فرار Total VFA (Mmol.L)
پروفایل اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر ۱۰۰ میلی مول) volatile fatty acids profiles (Mmol 100 <sup>-1</sup> Mmol)									
0.591	0.447	0.675	0.27	49.6	49.7	49.4	49.2	49.5	استات Acetate
0.011	0.010	0.014	0.21	23.1 <sup>a</sup>	23.2 <sup>a</sup>	23.0 <sup>a</sup>	23.3 <sup>a</sup>	21.9 <sup>b</sup>	پروپیونات Propionate
0.381	<0.001	0.001	0.01	2.10 <sup>a</sup>	2.04 <sup>b</sup>	2.05 <sup>ab</sup>	1.99 <sup>bc</sup>	1.94 <sup>c</sup>	ایزوبوتیرات Iso-butyrate
0.185	0.002	0.021	0.10	16.4 <sup>b</sup>	16.4 <sup>b</sup>	16.6 <sup>ab</sup>	16.6 <sup>ab</sup>	17.0 <sup>a</sup>	بوتیرات Butyrate
0.045	0.016	0.061	0.16	5.60 <sup>ab</sup>	5.57 <sup>b</sup>	5.62 <sup>ab</sup>	5.65 <sup>ab</sup>	6.36 <sup>a</sup>	ایزووالرات Iso-valerate
0.649	0.187	0.424	0.10	3.20	3.08	3.29	3.26	3.35	والرات Valerate
0.011	0.021	0.016	0.02	2.15 <sup>b</sup>	2.14 <sup>b</sup>	2.15 <sup>b</sup>	2.11 <sup>b</sup>	2.26 <sup>a</sup>	نسبت استات به پروپیونات Acetate : Propionate
P-Value			SEM	MSEX (میلی گرم بر لیتر)				فرا سنجه	
Q	L	Tr		600	450	300	150		صفر
0.461	<0.001	<0.001	1.89	69.5 <sup>c</sup>	76.1 <sup>c</sup>	85.8 <sup>b</sup>	90.9 <sup>ab</sup>	97.1 <sup>a</sup>	کل اسیدهای چرب فرار Total VFA(Mmol.L)
پروفایل اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر ۱۰۰ میلی مول) volatile fatty acid profiles (Mmol 100 <sup>-1</sup> Mmol)									
0.137	0.122	0.229	1.06	44.2	46.5	47.3	47.1	46.7	استات Acetate
0.027	<0.001	<0.001	0.26	22.7 <sup>a</sup>	22.3 <sup>a</sup>	21.0 <sup>b</sup>	20.6 <sup>b</sup>	21.1 <sup>b</sup>	پروپیونات Propionate
0.538	0.987	0.961	0.56	7.84	7.38	7.36	7.67	7.71	ایزوبوتیرات Iso-butyrate
0.251	0.978	0.501	0.41	16.2	15.2	15.6	15.9	15.9	بوتیرات Butyrate
0.775	0.758	0.967	0.42	5.89	5.48	5.64	5.69	5.57	ایزووالرات Iso-valerate
0.601	0.252	0.755	0.14	3.26	3.12	3.10	3.01	3.05	والرات Valerate
0.014	<0.001	0.003	0.05	1.95 <sup>b</sup>	2.09 <sup>ab</sup>	2.24 <sup>a</sup>	2.28 <sup>a</sup>	2.21 <sup>a</sup>	نسبت استات به پروپیونات Acetate: propionate

SEM: انحراف استاندارد میانگین ها، P-Value (تیمار = Tr، خطی = L، درجه دوم = Q) و حروف بالا<sup>a,b</sup> در هر ردیف نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار در سطح خطای ۰/۰۵ می باشد.

SEM: standard error of the means, P-Value (Tr: treatment, L: linear, Q: quadratic), <sup>a,b</sup>: different superscript letters indicate differences (P<0.05) between the treatments.



### نتیجه‌گیری کلی

مقاومت بالاتر باکتری‌های آمیلولایتیک به این افزودنی‌ها می‌باشد. در عین حال، کاهش غلظت کل اسیدهای چرب فرار به‌هنگام استفاده از عصاره نعناع با افزایش توده میکروبی و راندمان سنتز توده میکروبی و همچنین کاهش غلظت آمونیاک شکمبه‌ای همراه بود که همگی مبین بهبود راندمان استفاده از مواد مغذی جیره به‌موازات بهبود سنتز پروتئین میکروبی می‌باشد. در مجموع، به نظر می‌رسد استفاده از عصاره نعناع در سطوح پایین و متوسط می‌تواند موجب بهبود تخمیر شکمبه و کاهش هدررفت مواد مغذی جیره و در نتیجه کاهش اثرات زیست محیطی پرورش نشخوار کنندگان گردد.

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از هر دو افزودنی اسانس و عصاره نعناع دشتی موجب کاهش درصد گاز متان گردید، با اینحال، عصاره نعناع اثرات بارزتری در کاهش تولید متان داشت. علیرغم کاهش خطی میزان هضم شکمبه‌ای ماده خشک و آلی توسط هر دو افزودنی، استفاده از عصاره نعناع در سطوح پایین و متوسط، و استفاده از اسانس نعناع تا سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر معنی‌داری در کاهش هضم شکمبه‌ای نداشت. کاهش غلظت اسیدهای چرب فرار توسط هر دو افزودنی اسانس و عصاره نعناع با تغییر پروفایل اسیدهای چرب فرار به سمت افزایش نسبت مولی پروپیونات همراه بود که این امر حاکی از

### منابع

- Adesogan, A.T. 2009. Using dietary additives to manipulate rumen fermentation and improve nutrient utilization and animal performance. *20th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*. 13-38.
- Agarwal, N., Shekar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C., and Kamra, D.N. 2008. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*, 148:321-327.
- Ando, S., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K., & Bayaru, E. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science*, 82(2): 245-248.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis, 17th ed. *Association of official analytical chemists.*, VA, USA.
- Bach, A., Calsamiglia, S., and Stern, M.D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 88: E9-E21.
- Bardaweel, S. K., Bakchiche, B., ALSalamat, H. A., Rezzoug, M., Gherib, A., and Flamini, G. 2018. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L. (*Lamiaceae*) from Algerian Saharan atlas. *BMC complementary and alternative medicine*, 18: 1-7.
- Blummel, M., Makkar, H. P. S., and Becker, K. 1997a. *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 77: 24-34.
- Blummel, M., Steingäß, H., and Becker, K. 1997b. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15 N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77: 911-921.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., and López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176: 78-93.
- 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.

- Broudiscou, L.-P., Papon, Y., and Broudiscou, A.F. 2002. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. *Animal Feed Science and Technology*, 101: 183–189.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. 2006. Plant Extracts Affect *in Vitro* Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89: 761–771.
- Calabrò, S. 2015. Plant secondary metabolites. Rumen microbiology: From evolution to revolution, *Springer*, New Delhi, India, 400p.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., and Ferret, A. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2580–2595.
- Cleff, M.B., Meinerz, A. R., Xavier, M., Schuch, L.F., Schuch, L.F., Araújo, and Meireles, M.C. 2010. *In vitro* activity of origanum vulgare essential oil against Candida species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:116–23.
- Delgadillo-Ruiz, L., Bañuelos-Valenzuela, R., Gallegos-Flores, P., Echavarría-Cháirez, F., Meza-López, C., and Gaytán-Saldaña, N. 2021. Modification of ruminal fermentation *in vitro* for methane mitigation by adding essential oils from plants and terpenoid compounds. *Abanico veterinario*, 11:1-12.
- Dey, A., Paul, S. S., Lailer, P. C., and Dahiya, S. S. 2021. Reducing enteric methane production from buffalo (*Bubalus bubalis*) by garlic oil supplementation in *in vitro* rumen fermentation system. *SN Applied Sciences*, 3(2): 187.
- El-Zaiat, H.M., and Abdalla, A.L. 2019. Potentials of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil on ruminal methanogenesis, feed degradability, and enzyme activities *in vitro*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 30220–30228.
- El-Zaiat, H.M., Ré, D.D., Patino, H.O., and Sallam, S.M. 2019. Assessment of using dried vinasse rice to replace soybean meal in lambs diets: *In vitro*, lambs performance and economic evaluation. *Small Ruminant Research*, 173: 1–8.
- Faniyi, T. O., Adewumi, M. K., Jack, A. A., Adegbeye, M. J., Elghandour, M. M., Barbabosa-Pliego, A., and Salem, A. Z. 2021. Extracts of herbs and spices as feed additives mitigate ruminal methane production and improve fermentation characteristics in West African Dwarf sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 53: 1-8.
- García-Galicia, I. A., Arras-Acosta, J. A., Huerta-Jimenez, M., Rentería-Monterrubio, A. L., Loya-Olguin, J. L., Carrillo-Lopez, L. M., and Alarcon-Rojo, A. D. 2020. Natural oregano essential oil may replace antibiotics in lamb diets: Effects on meat quality. *Antibiotics*, 9(5), 248.
- Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., and Portugal, H. 2004. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research*, 18(12): 990-995.
- Golbotteh, M. M., Malecky, M., Aliarabi, H., Zamani, P., and Ganjkanlou, M. 2022. Dose-response effects of the Savory (*Satureja khuzistanica*) essential oil and extract on rumen fermentation characteristics, microbial protein synthesis and methane production *in vitro*. *Annals of Animal Science*, 22(3): 1001-1014.
- Hassan, R. A., Hamed, H. B., Sanad, M. I., and Said Ahmed, K. A. 2014. Free radicals scavenging activity of spearmint methanolic extract. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 5(7): 189-200.
- Hegarty, R., and Klieve, A. 1999. Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50: 1315-1320.
- Hosoda, K., Nishida, T., Park, W. Y., and Eruden, B. 2005. Influence of *Mentha* × *piperita* L. (*peppermint*) supplementation on nutrient digestibility and energy metabolism in lactating dairy cows. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 18(12): 1721-1726.
- Hristov, A.N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T.W., Harper, M.T., Weeks, H.L., Branco, A.F., Moate, P.J., Deighton, M.H., Williams, S.R.O., Kindermann, M., and Duval, S. 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative

- effect on milk production. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 112 (34): 10663e10668.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Shahid, M., Ashraf, M., and Przybylski, R. 2010. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata L.*) from Pakistan. *Journal of Essential Oil Research*, 22(1): 78-84.
- Joch, M., Kudrna, V., Hakl, J., Božik, M., Homolka, P., Illek, J., Tyrolová, Y., and Výborná, A. 2019. *In vitro* and *in vivo* potential of a blend of essential oil compounds to improve rumen fermentation and performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 251:176–186.
- Jouany, J.P. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *Journal of Nutrition*, 126:1335S–1346S.
- 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.
- Khejornsart, P., Cherdthong, A., and Wanapat, M. 2021. *In vitro* screening of plant materials to reduce ruminal protozoal population and mitigate ammonia and methane emissions. *Fermentation*, 7(3): 166.
- Kim, H., Jung, E., Lee, H. G., Kim, B., Cho, S., Lee, S., and Seo, J. 2019. Essential oil mixture on rumen fermentation and microbial community—an *in vitro* study. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 32(6): 808.
- Lawless, J. 1995. The Illustrated Encyclopaedia of Essential Oils. *Element Books Ltd*, 256p.
- Mahendran, G., Verma, S.K. and Rahman, L.U. 2021. "The traditional uses, phytochemistry and pharmacology of spearmint (*Mentha spicata L.*): A review." *Journal of Ethnopharmacology* 278: 114266.
- 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.
- Malecky, M., Albarello, H., and Broudiscou, L.P. 2012. Degradation of terpenes and terpenoids from Mediterranean rangelands by mixed rumen bacteria *in vitro*. *Animal* 6: 612-616.
- Matthews, C., Crispie, F., Lewis, E., Reid, M., O'Toole, P. W., and Cotter, P. D. 2019. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*, 10(2): 115-132.
- 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.
- Moss, A.R., Jouany, J.-P., and Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming, *Annales de zootechnie*, EDP Sciences, pp. 231-253.
- Nolan, J.V., and Dobos, R.C. 2005. Nitrogen transactions in ruminants. In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, Dijkstra J., Forbes J.M., France J. (eds.). *CABI Publishing*. Walingford, UK, pp. 177–206.
- Orzuna-Orzuna, J.F., Dorantes-Iturbide, G., Lara-Bueno, A., Miranda-Romero, L.A., Mendoza-Martínez, G.D. and Santiago-Figueroa, I. 2022. A meta-analysis of essential oils use for beef cattle feed: rumen fermentation, blood metabolites, meat quality, performance and, environmental and economic impact. *Fermentation*, 8: 254.
- 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.
- Patra, A.K., and Yu, Z. 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 4271–4280.
- Patra, A.K., and Yu, Z. 2013. Effects of gas composition in headspace and bicarbonate concentrations in media on gas and methane production, degradability, and rumen fermentation using *in vitro* gas production techniques. *Journal of Dairy Science*, 96: 4592–4600.

- Patra, A., Kamra, D., and Agarwal, N. 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128: 276-291.
- Roman-Garcia, Y., Mitchell, K. E., Denton, B. L., Lee, C., Socha, M. T., Wenner, B. A., and Firkins, J. L. 2021. Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. II: Relation with solid passage rate and pH on neutral detergent fiber degradation and microbial function in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 104(9): 9853-9867.
- Roman-Garcia, Y., White, R. R., and Firkins, J. L. 2016. Meta-analysis of postruminal microbial nitrogen flows in dairy cattle. I. Derivation of equations. *Journal of Dairy Science*, 99(10): 7918-7931.
- Sada, A., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K and Bayaru, E. 2003. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science*, 82:245-248.
- Sanjorjo, R. A., Tseten, T., Kang, M. K., Kwon, M., and Kim, S. W. 2023. In pursuit of understanding the rumen microbiome. *Fermentation*, 9(2): 114.
- Santoso, B., Kilmaskossu, A., and Sambodo, P. 2007. Effects of saponin from *Biophytum petersianum* Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 137:58–68.
- Schader, C., Muller, A., Scialabba, N E-H., Hecht, J., Isensee, A., Erb, K-H., Smith, P., Makkar, HPS., Klocke, P., Leiber, F., Schwegler, P., Stolze, M. and Niggli, U. 2015. Impacts of feeding less food-competing feedstuffs to livestock on global food system sustainability. *Journal of the Royal Society Interface* 12: 20150891.
- Skendi, A., Irakli, M., and Chatzopoulou, P. 2017. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants* 6, 62-69.
- Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., and De Feo, V. 2015. *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp. strains. *Molecules*, 20(8): 14402-14424.
- Szulc, P., Nowak, B., Hassan, M. U., Lechniak, D., Ślusarczyk, S., Bocianowski, J., and Cieslak, A. 2024. Potential of Paulownia Leaves Silage in Lamb Diet to Improve Ruminal Fermentation and Fatty Acid Profile– An Study. *Annals of Animal Science*, 24(1): 211-221.
- 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* L.): *in vitro* ruminal fermentation kinetics and digestibility. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(7): 1013-1020.
- Taghavi-Nezhad, M., Alipour, D., Flythe, M. D., Zamani, P., and Khodakaramian, G. 2013. The effect of essential oils of *Zataria multiflora* and *Mentha spicata* on the *in vitro* rumen fermentation, and growth and deaminative activity of amino acid-fermenting bacteria isolated from Mehraban sheep. *Animal Production Science*, 54(3): 299-307.
- Torres, R., Moura, D., Ghedini, C., Ezequiel, J., and Almeida, M., 2020. Meta-analysis of the effects of essential oils on ruminal fermentation and performance of sheep. *Small Ruminant Research*. 189: 106-148.
- Ungerfeld, E.M. 2015. Limits to dihydrogen incorporation into electron sinks alternative to methanogenesis in ruminal fermentation. *Frontiers in microbiology*, 6: 1272.
- 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.
- Wang, D., Huang J., Zhang Z., Tian X., Huang H., Yu Y., Zhang G., Ding J., and Huang, R. 2013. Influences of *Portulaca oleracea* extracts on *in vitro* methane emissions and rumen fermentation of forage. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11: 483–488.
- Wencelová, M., Váradyová, Z., Mihalíková, K., Čobanová, K., Plachá, I., Pristaš, P., Jalč, D., and Kišidayová, S. 2015. Rumen fermentation pattern, lipid metabolism and the microbial

- community of sheep fed a high-concentrate diet supplemented with a mix of medicinal plants. *Small Ruminant Research*, 125, 64–72.
- Wenner, B.A., de Souza, J., Batistel, F., Hackmann, T.J., Yu, Z., and Firkins, J.L. 2017. Association of aqueous hydrogen concentration with methane production in continuous cultures modulated to vary pH and solids passage rate. *Journal of dairy science*, 100(7): 5378-5389.
- Zhao, Y., Liu, M., Jiang, L., and Guan, L. 2023. Could natural phytochemicals be used to reduce nitrogen excretion and excreta-derived N<sub>2</sub>O emissions from ruminants?. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1): 140.

PROOF