نشریه علوم دامی ایران
دوره ۴۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲ (ص۳۹۵-۳۸۵)

بررسی تأثیر گیاه گلپر بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبهٔ گوسفند و تولید گاز متان به‌روش درون‌شیشه‌ای

ابراهیم نوریان سرور[1] و یوسف روزبهان[2]*
۱، دانش‌آموختهٔ دکتری تغذیهٔ دام، ۲، عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۸ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۱/۱۳)

چکیده

تأثیر سه سطح گیاه گلپر (*Heracleum persicum*) (صفر (شاهد)، ۲۸/۶۵، و ۵۷/۳۱ میلی‌گرم به‌ازای ۲۰۰ میلی‌گرم جیرهٔ پایه) بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبهٔ گوسفند و تولید گاز متان به‌روش درون‌شیشه‌ای بررسی شد. تولید گاز در تخمیر ۱ تا ۵۴ ساعته ثبت شد. فراسنجه‌های مطالعه‌شده عبارت از کل گاز تولیدی، گاز متان، نیتروژن آمونیاکی (NH_3-N)، تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی مادهٔ آلی، شاخص تفکیک‌پذیری (Partitining Factor=PF)، تودهٔ میکروبی، و غلظت اسیدهای چرب فرّار بودند. همچنین، اثر سطوح متفاوت گیاه گلپر بر جمعیت پروتوزوآیی کل و سه زیرخانوادهٔ *Entodiniinae*، *Ophryscolecinae*، *Diplodiniinae*، و خانوادهٔ *Isotrichdae* نیز بررسی گردید. ترکیبات ثانویهٔ گیاه گلپر (اسانس‌دار)، سرعت تخمیر (P=۰/۰۳۳، غیرخطی)، گاز حاصل از بخش نامحلول (b) (P=۰/۰۰۱، خطی)، گاز تولیدی در زمان‌های ۲۴ (P=۰/۰۰۱، خطی) و ۵۴ ساعت (P=۰/۰۱۶، خطی) تخمیر را کاهش داد. ترکیبات مؤثر گیاه گلپر، گاز متان تولیدی به‌ازای مادهٔ آلی تجزیه‌شده را در دو سطح اول و دوم (۲۸/۶۵ و ۵۷/۳۱ میلی‌گرم) به‌ترتیب ۱۷/۳ و ۱۱/۶ درصد کاهش داد (P=۰/۰۲۹، غیر خطی).گیاه دارویی گلپر ضمن کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در هر دو سطح استفاده‌شده (P=۰/۰۰۱، خطی)، شاخص PF را در هر دوسطح گیاه، بهبود داد (P=۰/۰۱۸، خطی).اسانس گیاه گلپر توانسته است تودهٔ میکروبی را در هر دو سطح گیاه دارویی به‌ترتیب ۱۷ و ۱۸ درصد افزایش دهد (P=۰/۰۰۱، غیر خطی).در کنار این گیاه دارویی، اسیدهای چرب فرّار کل و غلظت اسیداستیک کاهش یافت. همچنین، کاهش جمعیت پروتوزوآیی کل (P=۰/۰۳۳، غیرخطی)، زیرخانوادهٔ *Entodiniinae* (P=۰/۰۱۹، غیر خطی) و خانوادهٔ *Isotrichdae* (P=۰/۰۲۶، خطی) مؤید تأثیرات ضد پروتوزوآیی ترکیبات مؤثر گیاه گلپر است. نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه گلپر توانایی بهبود تخمیر شکمبه‌ای از طریق کاهش نیتروژن آمونیاکی، افزایش راندمان تولید پروتئین میکروبی، و کاهش گاز متان در شرایط درون‌شیشه‌ای را دارد.

واژه های کلیدی: پروتوزوآ، عامل تفکیک‌پذیری (PF)، فراسنجه‌های تخمیر، گاز متان، گلپر.

مقدمه

تجزیهٔ میکروبی مواد خوراکی در شکمبه سبب تولید اسیدهای چرب فرّار (اسیداستیک، اسیدپروپیونیک، و اسیدبوتیریک)، گازها (عمدتاً دی‌اکسید کربن و متان)، و تودهٔ میکروبی می‌گردد (Blümmel *et al*., 2005). گاز متان تولیدی برحسب نوع جیرهٔ دام سبب هدررفتن ۲-۱۲ درصد انرژی خام جیرهٔ مصرفی می‌شود و نوعی از گاز گلخانه‌ای است که در فرایند گرم‌شدن زمین مؤثر است (Eckard *et al*., 2010). در طی سال ۲۰۱۰، مقادیر ۱۵، ۲۴، و ۳۴ درصد از گاز متان (۱۰۰ تراگرم

* نویسنده مسئول: یوسف روزبهان تلفن: ۰۹۱۲۳۹۰۵۴۸۱ E-mail: rozbeh_y@modares.ac.ir

در سال، هر تراگرم=۱میلیون تن) تولیدی از نشخوارکنندگان به‌ترتیب متعلق به قارهٔ آسیا، آمریکای لاتین، و آفریقا بوده است (Reay *et al*., 2010).

روش آزمون گاز درون‌شیشه‌ای با سرنگ‌های مدرج مناسب‌ترین روش برای استفاده در کشورهای در حال توسعه است. دیگر روش‌های برون‌حیوانی مانند روش‌های تلی‌وتری و کیسهٔ نایلونی براساس اندازه‌گیری‌های جرم‌سنجی (گراوی‌متری Gravimetric) ناپدیدشدن سوبسترا را اندازه‌گیری می‌کنند. درحالی‌که روش اندازه‌گیری گاز متمرکز بر تولید و آشکارشدن محصولات تخمیر شده است. از مزیت‌های روش آزمون گاز این است که کینتیک‌های تخمیر می‌توانند با یک نمونه مطالعه شوند و ازاین‌رو مقدار کمی از نمونه لازم است یا تعداد بیشتری از نمونه‌ها را می‌توان در یک زمان ارزیابی کرد (Vercoe *et al*., 2010).از آن‌جا که خوراک با کیفیت‌تر، متان کمتری به‌ازای هر واحد مادهٔ آلی تجزیه‌شده تولید می‌کند، اندازه‌گیری نسبت مادهٔ آلی تجزیه‌شده (میلی‌گرم) به حجم گاز (میلی‌لیتر) تولیدی به‌عنوان شاخص تفکیک‌پذیری (PF) برای ارزیابی ارزش تغذیه‌ای مواد خوراکی ضروری است. در واقع، هنگامی‌که هدف، افزایش سطح تولید دام است، خوراکی با قابلیت تجزیه‌پذیری مادهٔ آلی و PF بیشتر توصیه می‌گردد (Vercoe *et al*., 2010).

آرکایا متانوژنیک (Methanogenic Archaea) در شرایط غیرهوازی شکمبه با دی‌اکسید کربن و گاز هیدروژن محیط، گاز متان تولید می‌کنند (Eckard *et al*., 2010) که به کاهش گاز هیدروژن موجود در محیط شکمبه می‌انجامد. درصورتی‌که گاز H_2 در محیط تجمع یابد، واکنش اکسیداسیون و احیای NADH مهار می‌شود و سبب کنترل واکنش‌های رشد میکروبی، هضم علوفه، و در پایان مهار تولید اسیدهای چرب زنجیر کوتاه می‌گردد (Joblin, 1999). ازاین‌رو انتخاب روشی مناسب در مطالعات کاهش گاز متان، که سبب کاهش غلظت گاز H_2 در شکمبه گردد، ضروری است (Eckard *et al*., 2010).پروتوزوآهای مژکدار از طریق تأمین H_2 لازم آرکایا برای فرایند تولید متان (Methanogenesis) همزیستی دارند (Newbold *et al*., 1995). هرچند پروتوزوآها نقش‌های متفاوتی در واکنش‌های تولید متان دارند، اما هنوز اطلاعات محدودی در خصوص نقش هر یک از آن‌ها در دفع متان در دست است (Morgavi *et al*., 2010).پروتوزوآهای Polyplastron و Epidinium caudatum به‌ترتیب نقش ضعیف و متوسط و I. prostoma وEntodinium caudatum نقش قوی در تولید متان دارند (Newbold *et al*., 1995; Ranilla *et al*., 2007)؛ که برای تأیید این یافته‌ها بررسی‌های بیشتری نیاز است.

آزمایش‌های غربالگری گیاهان دارویی به‌روش درون‌شیشه‌ای با هدف بررسی تأثیر گیاهان اسانس‌دار بر مهار تولید متان انجام گرفته است (Benchaar *et al*., 2011)، اما تاکنون گزارشی در زمینهٔ استفاده و تأثیر گیاه گلپر(*H*eracleum persicum) بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبهٔ نشخوارکنندگان گزارش نشده است. تأثیرات درمانی گیاه دارویی گلپر علیه بسیاری از بیماری‌ها تاکنون به‌خوبی شناخته شده است (Hemati *et al*., 2010).گلپر گیاهی یک‌ساله متعلق به خانوادهٔ Apiaceae است. ترکیبات هزگیل بوتیرات (۵۶/۵ درصد) (Hexyl butyrate)، اکتیل اسیداستیک (۱۶/۵درصد) (Octyl acetate)، هگزیل۲- متیل بوتانوات (۵/۲ درصد) (Hexyl 2-methylbutanoate) و هگزیل ایزوبوتیرات (۳/۴ درصد) (Hexyl isobutylate) به‌عنوان عوامل عمدهٔ مؤثر در اسانس گلپر شناسایی شده‌اند (Hemati *et al*., 2010). به سبب وجود این عوامل مؤثر در گیاه گلپر و بی‌اطلاعی از تأثیر آن بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه، مطالعهٔ حاضر به منظور ارزیابی تأثیر این گیاه بر متان تولیدی، تخمیر شکمبه، و جمعیت پروتوزوآیی گوسفند انجام گرفت.

مواد و روش آزمایش

دام و مدیریت آن

مایع شکمبهٔ لازم از سه رأس گوسفند نژاد افشاری مجهز به فیستولهٔ شکمبه با میانگین وزن ۲/۹±۴۳/۸ کیلوگرم گرفته شد. گوسفندان با جیرهٔ پرواری۶۰ درصد کنسانتره (جو، سویا، سبوس، نمک، جوش‌شیرین، و مکمل معدنی ویتامینه) و ۴۰ درصد علوفه (یونجهٔ خشک) و روزانه سه مرتبه (ساعات ۱۴،۹، و ۱۹) تغذیه شدند. نیاز گوسفندان به انرژی، پروتئین، مواد معدنی، و

ویتامین براساس توصیهٔ NRC (2007) تنظیم گردید. آب تازه به‌صورت مداوم در اختیارشان بود.

آزمون تولید گاز به‌روش برون‌حیوانی (IVGP) (*in vitro* gas production)

مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم جیرهٔ پایهٔ یونجه و کنسانتره (جو) با نسبت ۴۰ به ۶۰ به‌عنوان سوبسترای پایه استفاده گردید. گیاه خشک و تازهٔ گلپر در سه سطح صفر (شاهد)، ۲۸/۶۵، و ۵۷/۳۱ میلی‌گرم به‌ازای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا و هر سطح در چهار تکرار به محیط تخمیر اضافه شد (Garc´ıa-Gonz´alez *et al*., 2008 b). بطری‌های ویتن (Wheaton Bottle) ۱۱۷ میلی‌لیتری و محتویات داخل آن (۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا و ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری‌شده) در دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. محلول بافر مطابق روش Menke & Steingass (1988) تهیه شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری مقدار گاز تولیدی کل در هر بطری با سرنگ مدرج و گاز متان (گاز گروماتوگرافی) قرائت گردید. در آزمایش جداگانهٔ دیگری به‌منظور برآورد کینتیک تخمیر، آزمون تولید گاز با سرنگ‌های مدرج شیشه‌ای۱۰۰ میلی‌لیتری مِنک و به‌مدت ۵۴ ساعت انکوباسیون، انجام گرفت. آزمایش در سه نوبت با چهار تکرار در هر نوبت، انجام شد.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های تخمیر

بعد از پایان انکوباسیون، مقدار گاز تولیدی بطری‌های ویتن با سرنگ‌های مدرج اندازه‌گیری شد و براساس گاز تولیدی بلانک تصحیح گردید. با دستگاه گاز کروماتوگرافی (دستگاه شیماتزو ژاپن) با ستون فشرده (Supelco, St. Louis, MO, USA) و آشکارساز یونی شعله‌ای (Flame Ionization Detector) و کاربرد استاندارد خارجی گاز متان خالص(استاندارد با غلظت۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، و ۶۰۰ میکرولیتر متان)، مقادیر گاز متان تولیدی در هر بطری محاسبه شد. غلظت هریک از اسیدهای چرب فرّار استیک، پروپیونیک، و ان‌ـبوتیریک با دستگاه گاز کروماتوگرافی (شیماتزو ژاپن) و با ستون مویرگی (Capillary Column) و با استاندارد داخلی (۲-اتیل بوتیریک اسید) تعیین شد. شاخص نسبت استیک به پروپیونیک نیز محاسبه شد(Cottyn & Boucque, 1968). غلظت نیتروژن آمونیاکی به‌روش فنول‌ـهیپوکلریت و با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین گردید (Broderick & Kang, 1980). در این روش ابتدا مایع شکمبه بافری و اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال را با نسبت ۵ به ۱ مخلوط و قبل از قرائت نیتروژن، محلول را سانتریفیوژ شد و محلول رویی برای قرائت نیتروژن استفاده شد. برای تهیهٔ هر نمونه، مقدار ۵۰ میکرولیتر مایع شکمبه، ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فنل (۰/۱۵ گرم سدیم نیتروفری سیانید در ۱/۵ لیتر آب مقطر حل شد و سپس ۳۳ میلی‌لیتر فنل ۹۰ درصد به آن افزوده و حجم محلول با آب مقطر به ۳ لیتر رسانیده شد) و ۲ میلی‌لیتر معرف هیپوکلریت (۱۵ گرم هیدروکسید سدیم را ۲ لیتر آب مقطر حل شد، و مقدار ۱۱۳/۶ گرم از ترکیب $Na_2HPO_4 . 7\ H_2O$ به آن افزوده شد و بعد از حرارت خنک شد و سپس مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیپوکلریت ۵/۲۵ درصد به آن افزوده و با آب مقطر حجم نهایی به ۳ لیتر رسانیده شد). برای تهیهٔ محلول استاندارد آمونیاک (۱۰۰ میلی‌مولار) نیز مقدار ۰/۶۶۰۷ گرم سولفات آمونیوم در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال حل شد. سپس برای ترسیم منحنی استاندارد آمونیاک محلول در غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴، ۶، و ۱۰ میلی‌مولار تهیه و جذب نوری آن ثبت شد. با استفاده از جذب نوری و غلظت آمونیاک معادلهٔ رگرسیونی به‌دست آمد. سرانجام غلظت به‌دست‌آمده در ضریب تصحیح ۱/۱۷ ضرب شد.

تعیین شاخص PF، تودهٔ میکروبی تولیدی، و راندمان سنتز تودهٔ میکروبی

برای تعیین شاخص PF (معرف مقدار سنتز پروتئین میکروبی) از روش Makkar (2010) استفاده شد. شاخص PF عبارت است از میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده بخش بر میلی‌لیتر گاز تولیدی که مطابق با رابطهٔ ۱ محاسبه گردید (Vercoe *et al*., 2010). انتخاب گیاه براساس شاخص PF یعنی انتخاب قابلیت تجزیه‌پذیری بیشتر به‌ازای گاز تولیدی کمتر.

(رابطهٔ ۱):

$$PF=OMDe/IVGP=c–(a–b)/IVGP$$

که در معادلهٔ مذکور c مادهٔ آلی وزن‌شده در هر بطری (میلی‌گرم)، *a* مقدار مواد تجزیه‌نشده در هر بطری(*a* mg)، *b* مقدار خاکستر مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (*b* mg)، و IVGP گاز تولیدی است. مادهٔ آلی تجزیه‌شده نیز براساس رابطهٔ ۲ محاسبه شد (Vercoe et al., 2010).

$$OMDe\ (mg)=c-(a-b) \quad \text{(رابطهٔ ۲)}$$

بعد از اندازه‌گیری حجم گاز تولیدی در طی ۲۴ ساعت انکوباسیون، محتویات داخل بطری ویتن به‌داخل بشری انتقال داده شد و با محلول شویندهٔ خنثی (Neutral Detergent Solution=NDS) و ۱ ساعت حرارت در دستگاه مجهز به مبرد شسته شد. سپس محتویات داخل محلول شوینده با کاغذ صافی بدون خاکستر تصفیه شد و باقی‌مانده با آون و در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس و به‌مدت ۱۰ ساعت خشک گردید؛ آنگاه با کسر وزن بوتهٔ خالی از بوتهٔ با محتویات بعد از آون، مقدار مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (*a* mg) محاسبه شد. سپس بوته و محتویات داخل آن به کوره انتقال داده شد و در دمای ۵۵۰ درجهٔ سلسیوس مقدار خاکستر آن (*b* mg) محاسبه گردید. با تفریق مقدار *b* از *a*، مادهٔ آلی تجزیه‌نشده برحسب میلی‌گرم محاسبه شد (Vercoe *et al*., 2010).

مقادیر تودهٔ میکروبی تولیدی و راندمان سنتز تودهٔ میکروبی نیز با رابطهٔ ۳ و به‌روش Makkar (2010) محاسبه شد (Vercoe *et al*., 2010).

$$MM\ (mg)=[c-(a-b)]-[NG_{ml}\times 2.2] \quad \text{(رابطهٔ ۳)}$$

که در این رابطه:

MM= میلی‌گرم تودهٔ میکروبی تولیدشده

NG= میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی

2.2= ضریب استوکیومتری

اندازه‌گیری جمعیت پروتوزوآ

شمارش میکروسکوپی پروتوزوآ به‌روش Dehority (2004) انجام گرفت. در این آزمایش بعد از اتمام دورهٔ تخمیر، مایع شکمبه با نسبت ۱به ۵ با محلول فرمال سالین (مقدار ۸/۱ گرم NaCl خالص را در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل، سپس مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر فرمالین ۳۶ درصد را به آن افزوده شد) ترکیب شد و تا زمان شمارش در دمای یخچال نگهداری گردید. با نرم‌افزار دینوکاپچر (Dino Capture) نصب‌شده روی رایانه، و میکروسکوپ نوری (Car ZEISS Standard 20, Germany) و لام هموسیتومتر (Hemocytometer counting) سه زیرخانوادهٔ Entodiniinae، Ophryscolecinae، Diplodiniinae، و خانوادهٔ Isotrichdae شمارش گردید. در این روش با لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰x جمعیت پروتوزوآیی در ۶ تکرار شمارش شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

داده‌های آزمون تولید گاز (کل گاز تولیدی، گاز متان، اسیدهای چرب فرّار، نسبت اسیداستیک به اسیدپروپیونیک، غلظت نیتروژن آمونیاکی،PF، و تجزیه‌پذیری مادهٔ آلی) و جمعیت زیرخانوادهٔ پروتوزوآ با نرم‌افزار آماری SPSS۱۸ (2009) برای ۳ تیمار (سه سطح شاهد، ۲۸/۶۵، و ۵۷/۳۱ میلی‌گرم به‌ازای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا) و هر تیمار در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه گردید. داده‌ها براساس مدل آماری $Y_{ij}=\mu+T_{i+}e_{ij}$ تجزیه شدند که در آن: Y_{ij} مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار، و e_{ij} مقدار باقیمانده بود. برای مقایسهٔ میانگین هر تیمار با تیمار شاهد از روش آزمون دانت و مقایسهٔ دو به دو تیمارها با یکدیگر از آزمون دانکن در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ استفاده شد. چون داده‌های جمعیت پروتوزآ از نوع شمارشی است، نرمال‌بودن این داده‌ها ابتدا با آزمون کولموگروف‌اسمیرنوف بررسی و سپس تجزیه و تحلیل گردیدند.

نتایج و بحث

آزمون تولیدگاز، متان تولیدی، و پارامترهای تخمیر شکمبه

در مطالعات درون‌شیشه‌ای با شاخص گاز تولیدی حاصل از تخمیر ۲۴ تا ۹۶ ساعته یا بیشتر، بخش غیر محلول(*b*)، و سرعت تخمیر (*c*) با نرم‌افزار رایانه‌ای برآورد می‌شود. فرایند تخمیرِ کربوهیدرات‌های سریع‌تخمیر، سبب تولید اسیدپروپیونیک تقریباً بیشتری

در مقایسه با اسیداستیک می‌شود و مقدار زمانی که کربوهیدرات‌های آهسته‌تخمیر انکوباسیون می‌شوند، عکس می‌گردد.

افزایش مقدار گیاه گلپر در محیط تخمیر، گاز تولیدی از بخش دیرتخمیر (P=۰/۰۰۱) را به‌صورت خطی کاهش داد (جدول۱). این تغییرات به‌نحوی است که سطح بیشتر گیاه گلپر (۵۷/۳۱ میلی‌گرم) توانسته است سرعت تخمیر را نیز کاهش دهد (غیرخطی، P=۰/۰۳۳). مشابه این پژوهش، استفاده از سطوح متفاوت و ترکیبی روغن نارگیل و پودر سیر در مطالعهٔ برون‌تنی Kongmun *et al.* (2010) سبب شد مقادیر گاز به‌دست‌آمده برای بخش غیر محلول (b) و سرعت تخمیر (c) بین تیمارهای مطالعه‌شده معنی‌دار گردید.

ترکیبات مؤثر گیاه گلپر (هزگیل بوتیرات، اکتیل اسیداستیک، هگزیل ۲- متیل بوتانوات، و هگزیل ایزوبوتیرات (Hemati *et al.*, 2010)) توانسته‌اند احتمالاً از طریق تأثیر کاهشی بر باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های محیط تخمیر، گاز کل تولیدی در طی تخمیر ۵۴ و ۲۴ ساعته را در هر دو سطح گیاه، کاهش (خطی، *P*=۰/۰۱۶) دهند. از آنجا که تغییر در تولید نسبت اسیدهای چرب زنجیره‌کوتاه، از طریق تغییر در گاز تولیدی، منعکس می‌گردد (Vercoe *et al.*, 2010)،کاهش اسیدهای چرب فرّار کل نیز همراه با گاز کل تولیدی در این بررسی مشاهده می‌شود (جدول ۱). مشابه با تحقیق حاضر، تأثیر سطوح گوناگون روغن نارگیل و پودر سیر بر گاز تولیدی در مدت ۷۲ ساعت کاهشی بود و تفاوت تیمار آزمایشی با شاهد معنی‌دار شد، که ظاهراً به‌دلیل کاهش متان تولیدی است (Kongmun *et al.*, 2010). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، استفاده از دو نوع گیاه دارویی Rheum officinale (RH) و Frangula alnus (FR) در بررسی درون‌شیشه‌ای در چهار سطح ۴۸ ، ۹۱، ۱۳۵، و ۱۷۸ میلی‌گرم سبب کاهش گاز تولیدی شد (Garc´ıa-Gonz´alez *et al.*, 2008a). به نظر می‌رسد تأثیر مهارکنندگی این دو گیاه بر باکتری‌های تخمیرکننده سبب کاهش گاز شده است. همچنین استفاده از ۰ ، ۱۰ ،۱۵، ۲۰، ۲۵، و ۳۰ میلی‌گرم تانن متراکم گیاه Leucaena leucocephala در آزمون گاز درون‌شیشه‌ای (۵۰۰ میلی‌گرم سوبسترا و ۴۰ میلی‌لیتر مایع شکمبهٔ بافری) ضمن کاهش گاز متان، کل گاز تولیدی (میلی‌لیتر/گرم مادهٔ خشک) را کاهش معنی‌دار داد (Tan *et al.*, 2011) که کاهش گاز کل تولیدی را ناشی از کاهش قابلیت هضم مادهٔ خشک دانسته‌اند. گرچه، افزودن استئاریودیونیک اسید (Stearidonic acid) (SDA; C18:4n-3) در چند سطح شاهد ، ۱، ۵ ، ۲۰، و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط تخمیر به‌روش درون‌شیشه‌ای۲۴ ساعته، تأثیری بر گاز کل تولیدی نداشت، ولی این ترکیب، گاز متان (میلی‌لیتر/لیتر) را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (Amaro *et al.*, 2012).

برخلاف نتایج این بررسی، در برخی مطالعات دیگر مانند سه سطح ساپونین چای (۲، ۴، و ۶ میلی‌گرم) در شرایط درون‌شیشه‌ای (Hu *et al.*, 2005)، ۳ عصارهٔ پوستهٔ گیاه Acacia Concinna حاوی ساپونین و Emblica Officinalis،Terminalia belerica که حاوی ترکیبات فنولیک هستند، به‌روش درون‌شیشه‌ای (مایع شکمبهٔ گاومیش) (Patra *et al.*, 2006) و دو سطح اسانس نعناع (۰/۳۳ و ۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر) (Agarwal *et al.*, 2009) مقدار گاز کل تولیدی در دورهٔ تخمیر افزایش داشته است. البته Patra *et al.* (2006) افزایش در تولید گاز کل را ناشی از افزودن قند محلول عصاره در محیط تخمیر دانسته‌اند.

هردو سطح گیاه گلپر افزوده‌شده به محیط تخمیر احتمالاً توانسته‌اند از طریق کاهش جمعیت پروتوزوآیی یا آرکایا باکتری‌ها میزان متان تولیدی (میکرومول به‌ازای هر کیلوگرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده) را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش دهند (خطی، *P*=۰/۰۳۵ و غیر خطی P=۰/۰۲۹). گیاه گلپر توانسته است در دو سطح کاربردی ۲۸/۶۵ و ۵۷/۳۱ میلی‌گرم در مقایسه با شاهد به‌ترتیب۱۷ و ۱۱/۶ درصد گاز متان را کاهش دهد (جدول۱). مطالعهٔ Newbold *et al.* (1995) نشان دادکه در حدود ۹-۲۵ درصد ارتباط همزیستی بین آرکایاهای متانوژن و پروتوزوآی مژکدار وجود دارد و پروتوزوآی مژکدار شکمبه‌ای، H_2 لازم را به‌عنوان سوبسترا به‌منظور سنتز گاز متان برای متانوژن‌ها فراهم می‌کنند (Morgavi *et al.*, 2010). ازاین‌رو به نظر می‌رسد آثار کاهشی گیاه گلپر در تولید متان، به‌دلیل وجود اسانس

(Hemati *et al*., 2010) و تأثیرات مهارکنندگی آن بر پروتوزوآی مژکدار (Hu *et al*., 2005) و بر باکتری‌های متانوژنیک (Hess *et al*., 2003) و یا کاهش باکتری‌های سلولایتیک (Wang *et al*., 2000) بوده است همان‌طور که سبب افزایش تولید پروپیونات و کاهش نسبت اسیداستیک به پروپیونات نیز شده است (جدول۱). اثر ترکیبات مؤثر گیاهی (اسانس، تانن، ساپونین و...) بر تولید متان در منابع علمی گزارش‌های متناقضی دارد، اما مستندها و گزارش‌های جدید نشان می‌دهد که اسانس‌های گیاهی یا اجزای فعال‌سازندهٔ آن‌ها این توانایی را دارند که متانوژنزیز شکمبه‌ای را یا به طور مستقیم از طریق مهار آرکایا باکتری‌ها یا به طور غیر مستقیم از طریق مهار پروتوزوآ و کاهش سایر عوامل مرتبط با متان، مهار کنند (Benchaar *et al*., 2008).

مشاهدهٔ Evans & Martin (2000) که با تحقیق حاضر هم‌سو است، نشان می‌دهد که کاربرد تیمول (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) که جزء اصلی اسانس‌های گیاهی مشتق‌شده از گیاه آویشن است، در شرایط درون‌شیشه‌ای به خوبی تولید متان را مهار کرد، اما غلظت‌های اسیداستیک و اسیدپروپیونیک را کاهش داد. همچنین در مطالعهٔ Kamara *et al*. (2005) در بین عصاره‌های آزمایش‌شده (شامل Fennel ,Clove ,Garlic Onion، و Ginger) به‌روش درون‌شیشه‌ای، عصارهٔ متانول سیر بیشترین تأثیر کاهش‌دهندهٔ متان را با کاهشی ۶۴ درصدی داشت بدون این‌که اثر مضری بر قابلیت هضم غذا داشته باشد.

نتایج مطالعهٔ Garcia-Gonzalez *et al*. (2008a) نشان داد که مواد مؤثر گیاهی از طریق تأثیر بر جمعیت پروتوزوآیی نیز می‌تواند سبب کاهش متان گردد. در این بررسی ریشهٔ زمینی گیاه Rhubarb (Rheum officinal) (۴۸ ، ۹۱ ، ۱۳۵، و ۱۷۸ میلی‌گرم) تولید متان را از ۳۶/۹ تا ۷۵ درصدکاهش داد بدون این‌که تأثیری بر قابلیت هضم مواد غذایی داشته باشد. همچنین پوست گیاه Buckthorn (Rhamnus frangula) (۴۸ ، ۹۱ ، ۱۳۵، و ۱۷۸ میلی‌گرم) تولید متان را از ۳۳ تا ۶۱ درصد کاهش داد. اجزای سازندهٔ اسانس‌های گیاهی، به‌طور انتخابی توانایی مهار پروتوزوآ را دارند. استفاده از گیاه گلپر در هر دو سطح در مقایسه با تیمار شاهد غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم/لیتر) را کاهش داده است (خطی،P=۰/۰۰۱). کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای حاوی گیاه گلپر هم‌زمان با افزایش شاخص PF (راندمان سنتز پروتئین میکروبی) و مقدار پروتئین میکروبی تولیدشده، نشان می‌دهد که نیتروژن محیط احتمالاً در تولید پروتئین میکروبی استفاده شده است.

تولید آمونیاک در شکمبه به‌دلیل فعالیت باکتری‌های پروتئولیتیک و باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک بالا (HAP=Hyper-ammonia producing) (McIntosh *et al* ., 2003) است. باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک بالا در شکمبه با وجود تعداد کم (کمتر از ۰/۰۱ جمعیت باکتریایی) فعالیت دامیناسیون بالایی دارند (Russell *et al*., 1988). تحقیقات نشان داده است که استفاده ۱۰۰ میلی‌گرم/روز از اسانس گیاهی تا ۷۷ درصد از جمعیت باکتریایی HAP را کاهش داده است (Wallace, 2004). حضور ترکیبات ثانویهٔ گلپر در محیط تخمیر می‌تواند یا از طریق کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز (Hussain & Cheeke, 1995) یا از طریق کاهش باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک (Sivakumaran *et al*., 2004; McIntosh *et al* ., 2003) و یا از طریق باندشدن با پروتئین و تشکیل کمپلکس پروتئین-ترکیبات فنولیک (Beauchemin et al., 2008)، سبب کاهش نیتروژن آمونیاکی شده باشد. نتایج مشابهی نیز مبنی بر کم‌شدن نیتروژن آمونیاکی در حضور گیاه حاوی ساپونین (*Yucca schidigera*) (Pen *et al*., 2006) و عصارهٔ گیاه حاوی ساپونین Quillaja *saponaria* (Pen, 2007) و تأثیر کاهشی ساپونین چای بر نیتروژن آمونیاکی و افزایش پروتئین میکروبی (Mao *et al*., 2010) گزارش شده است. مقدار مادهٔ آلی تجزیه‌شده درون‌شیشه‌ای در بین تیمارها کاهش عددی را نشان داد، هرچند این تغییر معنی‌داری نیست. به نظر می‌رسد ترکیبات موثر گلپر تأثیر اندکی بر فعالیت آنزیم‌های مؤثر بر قابلیت هضم مادهٔ آلی را دارند. بر خلاف نتایج این تحقیق، Patra *et al*. (2006) تأثیر مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی T. Chebula، E.officinalis، و A.indica بر قابلیت گوارش مادهٔ آلی را ناشی از ترکیبات مؤثر این گیاهان بر فعالیت باکتریایی و آنزیمی دانسته‌اند. شاخص PF یا مادهٔ آلی تجزیه‌شده به‌ازای گاز

تولیدی گیاه گلپر در هر دو سطح افزایش داشته است (P=۰/۰۱۸) (جدول ۱). شاخص PF در این مطالعه در دامنهٔ عددی مطلوب ۲/۷۴-۴/۶۵ بود (Blümmel *et al.*, 1997). رابطهٔ عکس بین شاخص PF با متان تولیدی (Vercoe *et al.*, 2010) در این آزمون اثبات شده است. افزایش سنتز پروتئین میکروبی همراه با کاهش متان در بررسی اثر گیاه Rheum officinale و Frangula alnus (Garc´ıa-Gonz´alez *et al.*, 2008a)، ساپونین چای (Hu *et al.*, 2005) و گیاهان دارویی Sesbania sesban and Carduus (Goel *et al.*, 2008)نیز مشاهده شده است. ازاین‌رو مطابق با نظر Blümmel *et al.* (1997) افزایش شاخص PF در این بررسی نشان‌دهندهٔ بهبود راندمان تخمیر است.

جدول ۱. اثر گیاه گلپر بر فراسنجه‌های تخمیر برآوردشده در آزمون تولید گاز

فراسنجه‌های تخمیر	سطح گیاه افزودنی (میلی‌گرم)				SEM	سطح معنی‌داری	
	۰ (شاهد)	۲۸/۶۵	۵۷/۳۱			خطی	غیرخطی
b	۵۸/۰۱^{a}	۵۱/۰۰^{b}	۴۸/۰۰^{b}		۱/۶۹	۰/۰۰۱	۰/۲۱۴
c	۰/۰۹۰۷^{a}	۰/۰۹۲۳^{a}	۰/۰۸۲۳^{b}		۰/۰۰۴۱	۰/۶۹۸	۰/۰۳۳
گاز تولیدی (۵۴ ساعت)	۶۶/۵^{a}	۶۰/۷^{b}	۶۰/۳^{b}		۱/۸۴	۰/۰۱۶	۰/۱۳۶
گازتولیدی(۲۴ ساعت)	۵۱/۵^{a}	۳۹/۳^{b}	۳۷/۹^{b}		۱/۹۶	۰/۰۰۱	۰/۱۲۷
گاز متان (۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک/میکرومول)	۵۰۸/۳^{a}	۴۷۳/۸^{b}	۴۴۷/۳^{b}		۳۴/۷۵	۰/۰۱۳	۰/۰۳۹
گاز متان (میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده/میکرومول)	۴۵۰/۷^{a}	۳۷۲/۷^{b}	۳۹۸/۴^{b}		۵۲/۵۰	۰/۰۳۵	۰/۰۲۹
نیتروژن آمونیاکی (مول در لیتر)	۲۷/۱^{a}	۲۰/۵^{b}	۱۵/۳^{c}		۱/۷۵	۰/۰۰۱	۰/۶۸۹
تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی مادهٔ آلی (میلی‌گرم)	۱۷۷/۳	۱۷۵/۵	۱۷۴/۷		۱۵/۹۷	۰/۴۲۵	۰/۸۵۱
PF (میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده/ میلی‌لیتر گاز تولیدی)	۳/۴۴^{b}	۴/۴۶^{a}	۴/۶۱^{a}		۰/۳۸	۰/۰۱۸	۰/۷۹۴
تودهٔ میکروبی (میلی‌گرم)	۶۳/۷^{b}	۹۳/۶^{a}	۹۵/۹^{a}		۲/۲۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
راندمان سنتز میکروبی (درصد)	۳۶/۰^{a}	۵۳/۰^{b}	۵۴/۰^{b}		۰/۹۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
اسیدهای چرب کل (۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک/میلی‌مول)	۷۳/۸^{a}	۶۴/۱^{b}	۶۳/۱^{b}		۲/۲۶	۰/۰۴۶	۰/۳۰۶
اسید استیک (۱۰۰مول/مول)	۵۴/۲^{a}	۴۸/۸^{b}	۵۱/۶^{b}		۱/۰۶	۰/۲۷۹	۰/۰۴۶
اسید پروپیونیک (۱۰۰مول/مول)	۲۰/۹	۲۴/۶	۲۳/۷		۰/۹۱۲	۰/۲۲۷	۰/۲۳۸
اسید ان- بوتیریک (۱۰۰مول/مول)	۱۶/۰	۱۵/۷	۱۵/۸		۰/۵۲۹	۰/۹۱۵	۰/۸۳۵
نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک(C3:C2)	۲/۵۹	۲/۰۴	۲/۲۱		۰/۱۱۳	۰/۱۴۱	۰/۱۱۱

حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۱ ، P<۰/۰۵)، SEM: خطای معیار میانگین‌ها، b: پتانسیل تولید گازبخش نامحلول (میلی‌لیتر به‌ازای ۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک)، *c*: نرخ تخمیر بخش b (درصد/h).

اسیدهای چرب فرّار کل تحت تأثیر ترکیبات مؤثر (اسانس) گیاه گلپر، در مقایسه با تیمار شاهد کاهش (خطی،P=۰/۰۴۶) نشان داد. از آنجاکه کاهش واکنش‌های متانوژنزیز احتمالاً به تجمع گاز هیدروژن در محیط تخمیر می‌انجامد، بنابراین، تجمع گاز هیدروژن سبب توقف اکسیداسیون مجدد NADH و پس از آن باعث کم‌شدن تولید اسیدهای چرب فرّار شده است (Joblin, 1999).کاهش اسیداستیک و نبودن تغییری معنی‌دار در هریک از سایر اسیدهای چرب فرّار نشان می‌دهد که گیاه گلپر از طریق کاهش غلظت اسیداستیک توانسته است غلظت اسیدی چرب کل را کاهش دهد. ازاین‌رو در این تحقیق ترکیبات مؤثر (اسانس) گیاه گلپر سبب افزایش پروتئین میکروبی و کاهش اسید چرب فرّار کل شده است. کاهش اسیدهای چرب فرّار در مطالعهٔ Garc´ıa-Gonz´alez *et al.* (2008a) به علت استفاده از دو گیاه Rheum officinale و Frangula alnus و مطالعهٔ Patra *et al.* (2006) در اثر کاربرد عصارهٔ دو گیاه T. chebula و A. indica نیزگزارش شده

است. با توجه به رابطهٔ تولید متان با اسیداستیک، مشخص می‌شود که هرچه واکنش‌های متانوژنزیز کمتر گردد، تولید اسیداستیک نیز کمتر می‌شود (Garc´ıa-Gonz´alez *et al*., 2008a). درعین‌حال اسیداستیک محصول عمدهٔ پایانی متابولیسم مواد در پروتوزوآ است (Hess *et al*., 2003) و کاهش جمعیت پروتوزوآ (جدول ۲) در هر دو تیمار آزمایشی احتمالاً سبب کاهش اسیداستیک می‌گردد (Patra *et al*., 2006). همراه‌بودن کاهش متان و جمعیت پروتوزوآ با کمترشدن غلظت اسیداستیک در مطالعهٔ Hess et al . (2003) و Patra *et al*. (2006) مشاهده شده است. چون غلظت اسیدپروپیونیک افزایش معنی‌داری نداشته است، بنابراین نسبت اسیداستیک به اسیدپروپیونیک (C_2: C_3) تغییر مطلوبی را در هر دوسطح نشان نداده است.

جدول ۲. اثر گیاه گلپر بر جمعیت پروتوزوآ (۱۰^۵×/ میلی‌لیتر) در آزمون تولید گاز

پروتوزوآ	سطوح گیاه افزودنی (میلی‌گرم)			سطح معنی‌داری	
	۰ (شاهد)	۲۸/۶۵	۵۷/۳۱	خطی	غیر خطی
پروتوزوآی کل	۲/۲۱[a]	۱/۲۹[b]	۱/۳۳[b]	۰/۰۰۱	۰/۰۳۳
زیرخانوادهٔ					
انتودینینه	۱/۵۸[a]	۰/۸۳[b]	۰/۹۲[b]	۰/۰۱۰	۰/۰۱۹
افریواسکلوسینه	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
دیپلودینینه	۰/۵۰	۰/۵۴	۰/۵۰	۱/۰۰۰	۰/۲۰۷
ایزوتریچیدا (خانواده)	۰/۷۵[a]	۰/۵۰[b]	۰/۵۰[b]	۰/۰۲۶	۰/۵۰۶

شمارش پروتوزوآ

جمعیت پروتوزوآیی کل در اثر افزودن گیاه گلپر درهر دو سطح این گیاه کاهش داشته است (خطی، *P*=۰/۰۰۱). این کاهش احتمالاً به‌دلیل وجود ترکیب مؤثر (هزگیل بوتیرات، اکتیل اسیداستیک، هگزیل۲-متیل بوتانوات، و هگزیل ایزوبوتیرات) در این گیاه است (Hemati *et al*., 2010). این ترکیبات فعالیت ضدمیکروبی دارند و وجود هیدروژن در ساختار این ترکیبات در توانایی ضد میکروبی آن‌ها مؤثر است (Benchaar *et al*., 2011). گروه هیدروکسیل عوامل ثانویهٔ گیاه سبب بروز اختلال در انتقال یون از غشا سیتوپلاسم و باعث غیرفعال‌شدن آنزیم‌های پروتوزوآ، کاهش مقدار ATP سلول و کاهش گلوکز ورودی به سلول و درپایان به تجزیهٔ سلولی پروتوزوآ می‌انجامد (Benchaar *et al*., 2011). فعالیت ضدپروتوزوآیی اسانس گیاهی و یا گیاهان حاوی اسانس در مطالعهٔ Goel *et al*. (2008) نیز گزارش شده است. البته، گزارش‌های متفاوتی در خصوص تأثیر گیاهان حاوی اسانس بر جمعیت پروتوزوآیی وجود دارد. برای مثال، استفاده از ترکیب سیناماآلدئید (۰/۶ گرم در روز) و یوگنول (۰/۳ گرم در روز) سبب افزایش هلوتریش‌ها در گاو شده است (Cardozo *et al*., 2006). هرچند، Benchaar *et al*. (2007) نشان داده‌اند که استفاده از ۲ گرم در روز و ۷۵۰ میلی‌گرم در روز اسانس‌های تجاری تأثیری بر جمعیت پروتووزآیی مایع شکمبه گاوها نداشت. گرچه استفاده از اسانس درخت عرعر (Juniper Berry) در گاو شیری در مطالعهٔ Yang *et al*.(2007) تأثیری بر جمعیت پروتوزوآیی انتودینا نداشته است و سبب افزایش معنی‌دار ایزوتریچیدا در مقایسه با تیمار شاهد (۰/۳۶×۱۰^۵ در مقایسه با ۱۰^۵× ۰/۲۹) شده است. ازاین‌رو به‌سبب وجود چنین تناقضاتی در گزارش‌های علمی و برای اطمینان بیشتر، بررسی تأثیر افزودنی‌ها بر پروتوزوآ، ضروری است. از آنجا که انواع پروتوزوآ تأثیر و نقش متفاوتی بر تولید متان دارند (Morgavi *et al*., 2010)، بنابراین بهتر است به‌منظور تعیین مؤثرترین پروتوزوآی مژکدار در تولید متان، آن‌ها را به تفکیک بررسی کرد. ازاین‌رو، اثر گیاه گلپر بر جمعیت سه زیرخانواده و یک خانوادهٔ پروتوزوآ مطالعه شد. نتایج نشان می‌دهد که گیاه گلپر از طریق کاهش جمعیت زیرخانوادهٔ انتودینینه (خطی،P=۰/۰۱) و خانوادهٔ ایزوتریچیدا (خطی، P=۰/۰۲۶) سبب کاهش جمعیت پروتوزوآیی شده است. به نظر می‌رسد که خانوادهٔ ایزوتریچیدا و زیرخانوادهٔ انتودینینه بیشترین رابطه را با کاهش متان دارند. ازاین‌رو همین موضوع مؤید تأثیر ضد پروتوزوآیی گیاه گلپر است.

نتیجه‌گیری کلی

گیاه گلپر در شرایط درون‌شیشه‌ای توانایی بهبود تخمیر را از طریق کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی وگاز متان

همراه با افزایش شاخص PF دارد. همچنین خانوادهٔ ایزوتریچیدا و زیرخانوادهٔ انتودینینه بیشترین رابطه را با کاهش متان دارند.

به‌هر حال با توجه به این‌که شرایط این آزمایش درون‌حیوانی بوده است، بهتر است برای کسب اطمینان، این گیاه یا اسانس آن روی دام زنده نیز بررسی گردد.

REFERENCES

1. Agarwal,N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C. & Kamra, D. N. (2009). 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.
2. Amaro, P., Maia, M. R. G., Dewhurst, R. J., Fonseca, A. J. M. & Cabrita. A. R. J. (2012). Effects of increasing levels of stearidonic acid on methane production in a rumen in vitro system. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 252– 260.
3. Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F. & McAllister, T. A.(2008). Nutritionalmanagement for enteric methane abatement: a review.*Australian Journal Experimental Agriculture*, 48, 21–27.
4. Benchaar,C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Ouellet, D. R., Chiquette, J. & 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, 886-897.
5. Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A. & K. A. Beauchemin. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 209–228.
6. Benchaar, C. & Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166– 167, 338– 355.
7. Blümmel, M., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (1997).*In vitro* gas production: a technique revisited, *Journal Animal Physiology and Nutrition*, 77, 24–34.
8. Blümmel, M., Givens, D. I. & Moss, A. R. (2005). Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an *in vitro* gas procedure. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 379–390.
9. Broderick, G. A. & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determinations of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal Dairy Science*, 63, 64–75.
10. Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2006). Effects of alfalfa extracts, anise capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *Journal Animal Science*, 84, 2801-2808.
11. Cottyn, B. G. & Boucque, C. V. (1968). Rapid method for the gas-chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. *Journal Agriculture Food Chemistry*,16,105–107.
12. Dehority, B. A. (2004). *In vitro* determination of generation times for *Entodinium exiguum*, *Ophryoscolex purkynjei* and *Eudiplodinium maggii*. *Journal Eukaryote Microbial*, 51, 333–338.
13. Eckard, R. J., Grainger, C. & de Klein. C.A.M. (2010). Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*, 130, 47–56.
14. Evans, J. D. & Martin, S. A. (2000). Effects of thymol on ruminal microorganisms. Curr. Microbiol. 41: 336–340. FDA, Food and Drug Administration of the US, 21 CFR 184. Online. Available at: http://www.cfsan.fda.gov/eafus.html.
15. Garc´ıa-Gonz´alez, R., L´opez,S.,Fern´andez, M. & Gonz´alez, J. S. (2008a). Dose response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminalmethane production *in vitro.Animal Feed Science and Technology*, 145, 319–334.
16. Garc´ıa-Gonz´alez, R., L´opez, S.,Fern´andez, M., Bodas, R. & Gonz´alez, J. S. (2008b). Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 36–52.
17. Goel, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2008). Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 72–89.
18. Hemati, A., Azarnia, M. & Angaji, A. (2010). Medicinal effect of *Heracleum persicum* (Golpar). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 5 (3), 174-176.
19. Hess, H. D., Kreuzer, M., Diaz, T. E., Lascano, C.E., Carulla, J. E., Soliva, C. R. & Machmuller, A. (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunted and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109, 79–94.

20. Hobson, P. N. & Stewart, C. S. (1997). The rumen Microbial Ecosystem. Blackie Academic and Professional. Suffolk.
21. Hu, W. L., Liu, J. X., Yr, J.A., Wu,Y. M. & Guo, Y. Q. (2005). Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 120, 333–339.
22. Hussain, I. & Cheeke, P. R. (1995). Effect of *Yucca Scidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 51, 231–242.
23. Joblin, K. N. (1999). Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian. Journal Agriculture Research*, 50, 1307–1313.
24. Kamara, D. N., Agarwal, N. & Chaudhary, L. C. (2005). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary plant compounds. In: Soliva, C.R., Takahashi, J., Kreuzer,M. (Eds.), Proceedings of the 2nd International Conference of Greenhouse Gases and Animal Agriculture. ETH Zurich, Zurich, Switzerland, pp.102–111.
25. Kongmun, P., Wanapat, M., Pakdee, P. & Navanukraw, C. (2010). Effect of coconut oil and garlic powder on *in vitro* fermentation using gas production technique. *Livestock Science*, 127, 38–44.
26. Makkar, H. P. S. (2010). *In Vitro Screening of Feed Resourcesfor Efficiency of Microbial Protein Synthesis* (pp. 106-144). In: *In Vitro* Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies (Ed.), New York: Springer.
27. Mao, H. L., Wang, J.K., Zhou, Y. Y. & Liu, J. X. (2010). Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science*, 129, 56–62.
28. McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever. & Newbold, C. J. (2003). Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, Aug., p. 5011–5014.
29. Menke, K. H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *invitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28, 7–55.
30. Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C. & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4, 7, 1024–1036.
31. National Research Council. (2007). Nutrient Requirments of Small Ruminants. National academy Press, Washington, DC., USA.
32. Newbold, C. J., Lassalas, B. & Jouany, J. P. (1995). The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Letter Applied Microbial*, 21, 230–234.
33. Patra, A. K., Kamra, D. N. & 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.
34. Pen, B., Sar, C., Mwenya, B., Kuwaki, K., Morikawa, R. & Takahashi, J. (2006). Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. *Animal Feed Science and Technology*, 129, 175-186.
35. Pen, B. (2007). *Studies on manipulation of ruminal fermentation and methanogenesis by natural products*. Ph.D. dissertation, Major Chair of Animal Production the United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University.
36. Ranilla, M. J, Jouany J. P. & Morgavi, D. P. (2007). Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 675–680.
37. Reay, D., Smith, P. & Amstel, A.V. (2010). Methane and climate change: Ruminants. First ed. TJ International, UK.
38. Russell, J. B., Strobel, H. J. & Chen, G.(1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 872–877.
39. Sivakumaran, S., Molan, A., Meagher, L. P., Kolb, B., Foo, L. Y., Lane, G. A., Attwood, G. A., Fraser, K. & Tavendale, M. (2004). Variation in antimicrobial action of proanthocyanidins from Dorycnium rectum against rumen bacteria. *Phytochemistry*, 65, 17, 2485-2497.
40. SPSS. (2009). SPSS Version 18.0 for Windows. SPSS Inc., USA.
41. Tan, H.Y., Sieo, C. C., Abdullah, N., Liang, J. B., Huang, X. D. & Ho. Y. W. (2011). Effects of condensed tannins from Leucaena on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*.*Animal Feed Science and Technology*, 169, 185– 193.
42. Vercoe, E. P., Makkar, H. P. S. & Schlink, A.C. (2010). *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies (Ed.), In *Vitro Screening of Feed Resources for Efficiency of Microbial Protein Synthesis*, (pp. 106-144). New York: Springer.

43. Wallace, R. J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 621–629.
44. Wang, Y., McAllister, T.A., Yanke, L. J. & Cheeke, P. R. (2000). Effect of steroidal saponins from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal Applied Microbial*, 88, 887–896.
45. Yang, W. Z., Benchaar, C., Ametaj, B. N., Chaves, A. V., He, M. L. & McAllister, T. A.(2007). Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows .*Journal Dairy Science*, 90, 5671–5681.