مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۱ (۲۰۶-۱۹۳)

بررسی اثر برخی گیاهان دارویی بر پارامترهای هضم شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه نعمتی شیرزی[۱]، یوسف روزبهان[۲*] ، محمد امیر کریمی ترشیزی[۳] و جواد رضائی[۴]
۱، ۲، ۳، ۴، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار ، استادیار و دانشجوی دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۹ - تاریخ تصویب: ۹۱/۴/۳)

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، بررسی فعالیت ۲۳ گونه گیاه دارویی برای کاهش تولید گاز متان در شکمبه و بررسی پارامترهای گوارشی گوسفند با روش آزمایشگاهی (*in vitro*) بود. آزمایش با روش آزمون تولید گاز انجام شد. مقدار ۵۷/۳ میلی‌گرم از نمونه آسیاب شده گیاه دارویی مورد نظر به علاوه ۱۴۲/۷ میلی‌گرم خوراک پایه در ۴ تکرار درون بطری‌های ویتن (wheaton) ۱۲۰ میلی‌لیتری ریخته شد. انکوباسیون با استفاده از شیرابه شکمبه سه رأس گوسفند نر اخته، فیستوله‌دار، نژاد قزل، ۴ ساله، با وزن ۶۱/۸ کیلوگرم انجام گرفت. در پایان ۲۴ ساعت انکوباسیون، حجم کل گاز تولیدی، حجم گاز متان، غلظت آمونیاک و اسیدهای چرب فرار حاصل از تخمیر اندازه‌گیری شد. داده‌های به دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه آماری شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که حجم کل گاز تولیدی حاصل از تخمیر نمونه‌های حاوی موسیر، خارخسک و گل گنده در مقایسه با تیمار شاهد (خوراک پایه) افزایش یافت (P<۰/۰۵). نسبت گاز متان به کل گاز تولید شده حاصل از تخمیر تیمارهای حاوی موسیر، هل، آویشن، سیاهدانه، رزماری، ریوند چینی، بابونه، میخک و چای سبز در مقایسه با خوراک پایه بیش از ۲۰ درصد کاهش یافت (P<۰/۰۵). غلظت کل اسیدهای چرب فرار ناشی از تخمیر تیمارهای حاوی زنجبیل، سیاهدانه، بابونه، زنیان و چای سبز در مقایسه با خوراک پایه بیشتر بود (P<۰/۰۵). از سوی دیگر، غلظت آمونیاک در تیمارهای حاوی موسیر، گل گنده، قولنجان، هل، درمنه، شیرین بیان، رزماری، آنیسون، بابونه، زوفا و شاهتره کوهی در مقایسه با خوراک پایه کاهش یافت (P<۰/۰۵). بر اساس نتایج به دست آمده، مشخص شد که در بین گونه‌های مورد مطالعه، موسیر می‌تواند بدون آنکه حجم کل گاز تولیدی را کم کند، تولید گاز متان و غلظت آمونیاک را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: گیاه دارویی، تخمیر، متان، آمونیاک، اسیدهای چرب فرار، گوسفند.

مقدمه

ایران در منطقه خشک و نیمه‌خشک واقع شده و با کمبود نزولات آسمانی مواجه است. به همین دلیل، عمده مراتع کشور کیفیت مناسبی ندارند. پرورش دام در کشور عمدتاً وابسته به علوفه است و به دلیل کمبود کیفی و کمی علوفه، پژوهشگران به دنبال روش‌هایی هستند که بازده خوراک را بهبود بخشند. حدود ۱۰ درصد از انرژی موجود در خوراک طی تخمیر در شکمبه به صورت متان تلف می‌شود (Busquet et al., 2006). متان از گازهای گلخانه‌ای محسوب می‌شود، به طوری که حدود ۱۵ درصد از کل متان موجود در اتمسفر توسط نشخوارکنندگان تولید می‌شود و در افزایش دمای

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

کره زمین مؤثر است (Moss et al., 2000). بنابراین استفاده از روش‌هایی که موجب کاهش متان تولیدی شود، هم از لحاظ تغذیه‌ای و هم از لحاظ زیست‌محیطی اهمیت ویژه‌ای دارد. پیش از این از آنتی‌بیوتیک‌ها و یونوفرها به منظور کاهش این اثر منفی استفاده می‌شد؛ اما مصرف آن‌ها به علت ایجاد عوارض نامطلوب از سال ۲۰۰۳ در اتحادیه اروپا ممنوع گردید (Casewell et al., 2003). بسیاری از داروهای ضد میکروبی، افزودنی‌های ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانتها به صورت طبیعی یا تولیدات سنتتیک بر پایه مواد طبیعی در بازار موجود می‌باشد. مهمترین این داروها آنهایی هستند که بر فرایند تخمیر در شکمبه اثر دارند (Newbold et al., 1998). در سال‌های اخیر توجه دانشمندان به سمت استفاده از مواد طبیعی و بدون عوارض جانبی مانند گیاهان دارویی یا عصاره آنها که دارای ترکیبات فعال و مؤثر می‌باشد جلب شده است. اغلب گیاهان در مراحل مختلف رشد خود جهت جلوگیری از حمله حشرات و آفات، میکروب‌ها و قارچ‌ها، در بخشهای مختلف خود خصوصا اندام‌های در معرض خطر، موادی تولید می‌کنند که از آنها در مقابل این خطرات محافظت می‌کند(Cowan, 1999; Isman, 2000; Iason, 2005). برخی از این مواد برای حیوانات سمی هستند و از برخی از آنها می‌توان جهت کنترل و دستکاری محیط داخل شکمبه و فعالیت باکتریهای داخل آن استفاده کرد (Teferedegne et al., 1999; Chwalek et al., 2004). بسیاری از این گیاهان اثرات مفیدی بر پارمترهای شکمبه داشته‌اند و برخی از آنها بی تأثیر بوده‌اند (Ultee et al., 1999). بر اساس مطالعات اخیر، امکان استفاده از گیاهان دارویی برای تغییر و کنترل متابولیسم برخی از مواد در شکمبه ثابت شده است. از جمله این ترکیبات می‌توان به ساپونین‌ها، تانن‌ها، ارگانوسولفورها و سایر ترکیباتی اشاره کرد که از لحاظ متابولیکی فعال هستند و اثر بازدارنده بر فعالیت متانوژن‌های شکمبه دارند (Morgavi et al., 2010). محققان مختلف اثر روغن‌های ضروری (Newbold et al., 2004; Acamovic & Brooker, 2005; Castillejos et al., 2007)، ساپونین‌ها (Wallace et al., 1994; Hristov et al., 1999; Lila et al., 2003; Liu et al., 2003)، ارگانوسولفورها (Amagase, 2006) و پلی‌فنلها (Dorman & Deans, 2000; Yildiz et al., 2005; Castillejos et al., 2007) را بر متابولیسم شکمبه گزارش کرده‌اند.

مکانیسم عمل ترکیبات فعال و مؤثر موجود در برخی از گیاهان دارویی تا حدودی بررسی شده است. این مواد با مهار کردن پروتئاز باکتریایی موجب کاهش هضم پروتئین و غلظت آمونیاک شکمبه شده و در نهایت موجب مصرف آنها در روده می‌گردند (Wang et al., 1997). کاهش غلظت آمونیاک در شکمبه به دلیل افزایش تولید پروتئین میکروبی و یا کاهش تجزیه پروتئین موجود در خوراک صورت می‌گیرد (Wallace et al., 1994). برخی مواد مؤثر در گیاهان دارویی از دآمیناسیون اسیدهای آمینه ممانعت می‌کنند (Castillejos et al., 2007; Chizzola et al., 2004). مهمترین اثر روغن‌های ضروری، فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشد (Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004). این روغن‌ها به علت دارا بودن خاصیت چربی دوستی با اتصال مستقیم به غشای سلول باکتری و یا غیر مستقیم با صدمه زدن به پروتئین‌های غشای سلول موجب تخریب غشای پلاسمایی باکتری شده و با تغییر سیالیت غشای پلاسمایی موجب تجزیه سلول می‌شوند (Burt, 2004). این عمل سرعت رشد باکتری‌ها را کاهش می‌دهد و موجب تغییراتی در تخمیر و پروفایل اسیدهای چرب می‌شود (Calsamiglia et al., 2007). مکانیسم‌های دیگری مانند جلوگیری از سنتز ریبونوکلئیک اسید و دزوکسی ریبونوکلئیک اسید نیز پیشنهاد شده است که نشانگر توانایی عملکرد این ترکیبات است (Feldberg et al., 1988). در برخی از سلولها، روغن‌های ضروری موجب دناتوره شدن پروتئینها نیز می‌شوند (Min et al., 2002). ساپونین‌ها ترن‌آور پروتئین باکتریایی را کاهش می‌دهند (Wallace et al., 1994) و برای پروتوزوا خاصیت سمی دارند (Williams & Coleman, 1992) که علت آن خاصیت تخریب‌کنندگی غشای پلاسمایی از سوی ساپونین‌ها به دلیل گرایش آن به ترکیب آگلیکون استرولهای غشا به ویژه کلسترول است (Glauert et al., 1962). مواد مؤثر از جمله آنتول، بنزیل سالسیلات، کارواکرول و یوگنول موجب کاهش نیتروژن آمونیاکی، میزان اسیدهای چرب

فرار و کاهش در کل میزان تخمیر شکمبه شده‌اند (Busquet et al., 2006).

تانن‌ها و استروئید ساپونین در کاهش جمعیت پروتوزوایی شکمبه بسیار مؤثرند (Wallace et al., 1994; Min et al., 2002). ساپونین با مهار پروتئاز و تانن با تأثیر بر جمعیت پرتوزوایی فعالیت متانوژن‌ها را کاهش می‌دهند (Iason, 2005). این ترکیبات مؤثر در برخی از گیاهان دارویی به مقدار زیادی وجود دارد (Greathead, 2003). تعداد محدودی از مواد مؤثر و ترکیبات فعال مربوط به آنها در این زمینه شناسایی شده‌اند و هنوز باید در این زمینه تحقیقات بیشتری صورت گیرد (Hart et al., 2006). از سوی دیگر، نوع و میزان اثر این گیاهان دارویی به تناسب نوع و غلظت ماده مؤثر موجود در آن‌ها متفاوت است و مقدار ماده مؤثر تحت تأثیر عوامل محیطی مانند نور، حرارت و رطوبت قرار دارد که این عوامل موجب می‌شوند و حتی یک گونه گیاه دارویی که در محیط‌های متفاوت رشد کرده دارای مقادیر متفاوتی از مواد مؤثر باشد (Dudareva et al., 2004). هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر برخی از گیاهان دارویی موجود در ایران بر تولید گاز متان، غلظت آمونیاک و اسیدهای چرب فرار در شیرابه شکمبه گوسفند به روش *in vitro* بود.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد خوراکی

در این مطالعه ۲۴ سوبسترا یعنی خوراک پایه به تنهایی و تیمارهای حاوی خوراک پایه به‌علاوه ۲۳ گونه گیاه دارویی شامل موسیر (*Alium hertifolium*)، خارخسک (*Tribulus terrestris* L.)، گل گنده (*Foetida ferula-assa*)، قولنجان (*Alpinia officinarum*)، زنجبیل (*Zingiber officinale* Rose)، هل (*Elettaria cardamomum*)، آویشن (*Thymus vulgaris*)، سیاهدانه (*Nigella sativa*)، هلیله سیاه (*Nigrae myrobalani* chebulae)، درمنه (*Achillea milhemsii*)، شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، ریوند چینی (*Rheum palmatum*)، انیسون (*Pimpinella anisum*)، بابونه (*Chamaemelum nobile*)، میخک (*Syzgium aromaticum*)، خرفه (*Portulaca oleracea*)، زوفا (*Hyssopus officinalis*)، زنیان (*Trachyspermum copticum*)، شاهتره کوهی (*Fumaria officinalis* Lan)، سماق (*Rhus coriaria*)، چای سبز (*Thea sinensis*) و بومادران (*Achillea millefolium* L.) مورد بررسی قرار گرفت. تمامی گیاهان دارویی مورد استفاده از گیاهان بومی ایران بودند و بر اساس خاصیت شناخته شده ضد میکروبی‌شان انتخاب شدند.

آزمون تولید گاز و اندازه‌گیری پارامترهای تخمیری با روش آزمایشگاهی

خوراک پایه شامل مخلوطی از یونجه خشک و جو (۳ قسمت جو و ۲ قسمت یونجه) بود که با استفاده از الک ۲ میلی‌متری آسیاب شدند (Garcia-Gonzalez et al, 2005).

مقدار ۵۷/۳ میلی‌گرم از نمونه آسیاب شده گیاه دارویی مورد نظر به علاوه ۱۴۲/۷ میلی‌گرم خوراک پایه وزن گردید و درون بطری‌های ویتن (wheaton) ۱۲۰ میلی‌لیتری ریخته شد. انتخاب نسبت خوراک و گیاه دارویی در محیط انکوباسیون بر اساس اصول ویژه‌ی آزمایشهای *in vitro* بود، که با شرایط *in vivo* متفاوت است.

بر اساس پژوهش انجام شده توسط Garcia-Gonzalez et al. (۲۰۰۸)، طی آزمایش حاضر در ابتدا نسبت ۱۴ درصد از کل سوبسترای مورد بررسی در گاز تست گیاه دارویی در نظر گرفته شد و آزمون گردید. بر اساس نتایج به دست آمده کاربرد این نسبت از گیاه دارویی مناسب نبود و پاسخ خاصی را در پی نداشت. لذا، با مشاوره حضوری نویسنده با پروفسور جیمی نیوبولد مستقر در دانشگاه ابرسویث (ولز) در کشور انگلستان بر اساس توصیه ایشان از مقدار دو برابر گیاه دارویی در محیط انکوباسیون استفاده گردید.

لذا، نسبت ۲۸ درصد گیاه دارویی و ۷۲ درصد جیره پایه در پژوهش حاضر استفاده شد. بطری‌های حاوی هر گیاه دارویی در ۴ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. تعداد ۴ بطری بدون گیاه دارویی نیز به عنوان شاهد در هر دور آزمایشی در نظر گرفته شد. برای تهیه شیرابه شکمبه از سه رأس گوسفند نر اخته، فیستوله دار، نژاد

قزل، هم سن (۴ ساله)، با وزن تقریباً برابر (۶۱/۸ کیلوگرم) استفاده گردید. گوسفندان دو وعده در روز به فواصل مساوی و منظم با جیره‌ای حاوی ۷۰۰ گرم در کیلوگرم علوفه خشک و ۳۰۰ گرم در کیلوگرم مخلوط کنسانتره، به میزان ۱/۱ برابر نیاز نگهداری، تغذیه شدند. آب تازه نیز به طور آزاد در اختیار دام‌ها قرار داشت.

شیرابه شکمبه، پیش از تغذیه صبحگاهی، از دو بخش جامد و مایع محتویات شکمبه جمع‌آوری و تحت جریان دی‌اکسید کربن در دمای ۳۹ درجه سیلسیوس به طور کامل مخلوط و سپس با استفاده از پارچه تنظیف چهار لایه صاف گردید. نمونه‌ها طبق روش منکی و استینگاس (Menke & Steingass, 1987) به مدت ۲۴ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفتند و بلافاصله پس از انکوباسیون مقدار کل گاز تولید شده اندازه‌گیری شد. نمونه‌برداری از گاز تولیدی جهت اندازه‌گیری میزان تولید گاز متان، و نمونه‌گیری از شیرابه شکمبه انکوباسیون شده برای تعیین آمونیاک و اسیدهای چرب فرار موجود در هر بطری ویتن انجام شد.

برای اندازه‌گیری غلظت اسیدهای چرب فرار هر ۱/۵ میلی‌لیتر مخلوط شیرابه داخل ویتن با ۰/۳۷۵ میلی‌لیتر محلول OPAEB (مخلوط ارتوفسفریک ۲۰ درصد و ۲- اتیل بوتیریک اسید) مخلوط و جهت تعیین اسیدهای چرب فرار تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس نگهداری شد (Stewart & Duncan, 1985). اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار در حضور استاندارد داخلی توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی (مدل UNICAM 4600) انجام شد و مقدار کل اسیدهای چرب فرار و همچنین نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک محاسبه شد.

میزان گاز متان موجود در هر بطری ویتن توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی (مدل UNICAM 4600) و با استفاده از استاندارد خارجی تعیین گردید.

برای تعیین غلظت آمونیاک، شیرابه موجود در هر شیشه ویتن به نسبت ۵ به ۱ با اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال رقیق، و بلافاصله تا روز قرائت جذب نوری در یخچال نگهداری شد. غلظت آمونیاک با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد (Broderick & Kang, 1980).

آنالیز آماری

هر گیاه دارویی در دو سطح صفر و ۵۷/۳ میلی‌گرم و در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی در نظر گرفته شد. آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و رویه GLM صورت پذیرفت (SAS, 2001). مقایسه میانگین‌های بین ۲۳ گونه گیاه دارویی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار ۵ درصد انجام شد (Steel & Torrie, 1980).

نتایج و بحث

دلایل فراوانی در تحقیقات اخیر مبنی بر مؤثر بودن ترکیبات موجود در گیاهان دارویی بر تخمیر شکمبه و قابلیت استفاده از آن در کنترل محیط شکمبه در جهت بهبود عملکرد دام و در استفاده از مواد غذایی توسط نشخوارکنندگان در دست است. تعداد محدودی از مواد مؤثر و ترکیبات فعال مربوط به آنها در این زمینه شناسایی شده‌اند. اما دامنه این ترکیبات شناخته شده محدود است و هنوز باید در این زمینه تحقیقات بیشتری صورت گیرد (Hart et al., 2006). در پژوهش حاضر، در بخش بحث به برخی از مواد مؤثر موجود در این گیاهان نیز اشاره اجمالی شده است.

تأثیر گیاهان دارویی بر کل حجم گاز تولید شده

داده‌های مربوط به حجم گاز تولیدی حاصل از ۲۴ ساعت تخمیر آزمایشگاهی نمونه‌ها در جدول ۱ آمده است. میزان گاز تولید شده از نمونه‌های حاوی گیاهان دارویی رزماری، ریوند چینی، آنیسون، شیرین‌بیان، شاهتره، سماق، بابونه، خرفه، زوفا، میخک، زنیان، بومادران و چای سبز در مقایسه با گاز تولید شده در تیمار شاهد کمتر بود ($P<0/05$)؛ اما در تیمارهای حاوی موسیر، خارخسک و گل‌گنده به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). گزارش شده که آلیسین (یکی از ترکیبات سولفوردار موجود در موسیر) به طور مستقیم بر کاهش مخمرهای متانوژن شکمبه اثر دارد، بدون آن که در تعداد کل باکتریهای شکمبه و کل اسید چرب فرار تغییری ایجاد شود (Busquet et al., 2005). مقدار گاز تولید شده می‌تواند بیانگر گوارش‌پذیری مواد خوراکی مورد استفاده نیز باشد (Menke & Steingass, 1987). کاهش معنی‌دار مشاهده شده در حجم گاز

تولیدی در برخی از تیمارها می‌تواند بیانگر اثر منفی آن گیاهان دارویی بر گوارش میکروبی خوراک در شکمبه باشد که ممکن است به علت تأثیر مواد مؤثر موجود در این گیاهان بر عملکرد جمعیت میکروبی شکمبه باشد که از برخی فعالیت‌های گوارشی آنها می‌کاهد یا آن را متوقف می‌کند (Ultee et al., 1999). مهمترین اثر اسانس‌ها فعالیت ضد باکتری و ضد قارچ آنها می‌باشد (Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004). در برخی از موارد سلول‌ها توسط پمپ یونی این عدم تعادل را جبران، و از مرگ سلول جلوگیری می‌کنند. این عمل موجب صرف مقادیر فراوانی از انرژی می‌شود و سرعت رشد باکتری‌ها را کاهش می‌دهد. این تغییر در سرعت رشد باکتری‌ها موجب تغییراتی در تخمیر و پروفایل اسیدهای چرب می‌شود (Calsamiglia et al., 2007). برای مثال، گزارش شده که تیمول (موجود در گیاه زنیان) موجب از هم گسیختن غشای سلولی به علت کاهش انتقال ATP داخل سلولی و افزایشATP خارج سلولی میکروب می‌شود. دسته‌ای از این مواد (اسانس‌ها) گرایش زیادی به غشای پلاسمایی باکتری‌ها دارند. تیمول می‌تواند با صدمه‌زدن به غشای خارجی، موجب محدودیت رشد باکتری‌های گرم منفی شود (Helander et al., 1998).

این تغییرات بر میزان گاز تولیدی و گوارش‌پذیری مؤثر خواهد بود. شاید وجود تانن‌ها و اسانس نیز در برخی گیاهان مذکور (مانند رزماری، سماق و بابونه) در کاهش کل گاز تولید مؤثر بوده است. گزارش شده که تانن‌های قابل هیدرولیز در مقادیر زیاد برای نشخوارکنندگان و جمعیت میکروبی شکمبه سمی است. اثر محدود کننده تانن‌های متراکم در کاربرد مواد مغذی و کاهش در فعالیت‌های آنزیمی نیز گزارش شده است (Makkar, 2003). در بسیاری از مطالعات مشابه گزارش شده که استفاده از گیاهان دارویی یا مواد موثر موجود در آنها موجب کاهش مقدار قابلیت هضم می‌شود (Garcia-Gonzalez et al., 2005).

اما در برخی از مطالعات تغییر معنی‌داری در مقدار گاز و به تبع آن در مقدار قابلیت هضم مشاهده نشد (MacIntosh et al., 2003) و در تعداد اندکی از تحقیقات انجام شده افزایش قابلیت هضم خوراک طی انکوباسیون ۲۴ ساعته گزارش شد (Agarwal et al., 2009).

تأثیر گیاهان دارویی بر تولید گاز متان

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، درصد گاز متان نسبت به کل گاز تولیدی در تیمار حاوی زنیان افزایش یافت. در سایر تیمارهای حاوی گیاهان دارویی درصد متان تولید شده نسبت به کل گاز تولیدی کاهش یافت. از سوی دیگر، درصد کاهش گاز متان نسبت به خوراک پایه در تیمارهای حاوی موسیر، هل، آویشن، سیاهدانه، رزماری، ریوند چینی، بابونه، میخک و چای سبز بیش از ۲۰ درصد بود. می‌توان گفت گیاهانی که در مقایسه با تیمار شاهد تولید متان را بیش از ۲۰ درصد کاهش داده‌اند، در واقع دارای مواد مؤثر برای کاهش متان بوده‌اند (Garcia-Gonzalez et al., 2005). در کل، گزارش شده که مواد مؤثر موجود در گیاهان دارویی می‌توانند از طریق اختلال در مکانسیم‌های انتقال الکترون، تغییر در غلظت یون‌های سلولی، انتقال پروتئین، فسفوریلاسیون و دیگر واکنش‌های آنزیمی سبب تخریب سلول باکتری‌های متانوژن (آرکایا باکتری) و همچنین تخریب سلول پروتوزوآ و به دنبال آن کاهش هیدروژن تولیدی شوند (Benchaar et al., 2008). مکانیسم عمل گیاهان و مواد مؤثر موجود در آنها به طور کامل بررسی نشده و نیاز به مطالعات گسترده دارد. به هر حال، در این پژوهش تا حد ممکن سعی شد مکانیسم عمل و مواد مؤثر موجود در گیاهان مورد بررسی بحث گردد. موسیر (که در پژوهش حاضر تولید متان را کاهش داده است) دارای ترکیبات ارگانوسولفوره و حاوی ترکیبات مؤثر آلیسین (Allicin)، آلیل (Allyl)، آلیل‌سولفید (Allyl sulfide)، دی‌آلیل دی‌سولفید (Diallyl Disulfide)، آلیل مرکاپتان (Allyl Mercaptan) (Benchaar et al., 2008)، آلیناز (Alliinase)، S-آلیل-سیستئین (S-allyl-cysteine)، دی‌آلیل تری‌سولفید (diallyldisulphide) و متیل آلیل تری‌سولفید (Methylallyltrisulphide) می‌باشد (Azadi et al., 2009).

مطالعات باکتریایی با استفاده از real time PCR نشان داده که آلیسین متانوژن‌ها را به‌طور مستقیم کاهش می‌دهد (Hart et al., 2008). در سایر پژوهش‌ها

نیز استفاده از ترکیبات ارگانوسولفوره از طریق کاهش متانوژن‌ها به ترتیب سبب کاهش ۶۴ (Kamra et al., 2005) و ۶۹ درصدی (Busquet et al., 2005) متان تولیدی شده است. گزارش شده که ترکیبات مؤثر موسیر تأثیر زیادی بر دامنه وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارند و چندین مکانیسم عمل همچون مهار سنتز اسید ریبونوکلئیک، اسید دزوکسی ریبونوکلیئیک و پروتئیناز سلول برای این تأثیر پیشنهاد شده است. اما مکانیسم اصلی ضد میکروبی آن به‌دلیل ظرفیت و توانایی واکنش گروه سولفیدریل (SH-) با دیگر ترکیبات فعال می‌باشد (Calsamiglia et al., 2007).

همانگونه که ذکر شد استفاده از گیاه آویشن نیز تولید متان را کاهش داد. آویشن دارای ترکیبات مؤثر تیمول (Thymol)، کارواکرول (2-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol) (Carvacrol)، رو-سیمن (p-Cymene) و گاما-ترپینن (γ-Terpinene) می‌باشد. تیمول و کارواکرول موجود در این گیاه به دلیل وجود گروه هیدروکسیل در ساختار فنولیک خود، دارای اثرات گسترده ضد باکتریایی بر انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشد (Benchaar & Greathead, 2011). تیمول و کارواکرول از طریق کاهش مخزن ATP داخل سلولی و افزایش ATP خارج سلولی سبب تخریب غشای سلولی باکتری می‌گردد (Benchaar et al., 2008).

همچنین رو-سیمن موجود در آویشن توانایی تجمع در غشای پلاسمایی سلول باکتری را داشته و سبب پاره شدن این غشاء و تراوش یون‌ها می‌گردد (Benchaar & Greathead, 2011). طبق گزارش دیگری، منوترپن‌های غیر فنولیک مانند رو-سیمن و گاما-ترپینن می‌توانند از غشای پلاسمایی باکتری‌های متانوژن به داخل پلاسما عبور کنند، لذا اثر ضد باکتریایی دارند (Cristani et al., 2007). مطالعات انجام شده توسط Evans & Martin (2000) نیز نشان داده است که تیمول اسانس آویشن از طریق مهار جذب گلوکز توسط باکتری، توانایی مهار تولید متان را دارد. در کل، Macheboeuf et al. (۲۰۰۸) ذکر کرده‌اند که ترکیبات موجود در آویشن از طریق مکانیسم‌های ذکر شده جمعیت متانوژن‌ها و تولید متان را کاهش می‌دهند. گیاه رزماری، که بر کاهش تولید متان مؤثر بوده، حاوی ترکیبات آلفا-پینن (α-Pinene)، بتا-پینن (β-Pinene)، ۱،۸-سینول (1,8-Cineole) و کامفور (Campho) می‌باشد، که ۱،۸- سینول با ۴۸ درصد بیشترین مقدار ترکیبات مؤثر را تشکیل می‌دهد (Benchaar et al., 2008; Castillejos et al., 2008). گیاه مذکور اثر زیادی بر سلول‌های پروتوزوایی داشته و از طریق تخریب سلول پروتوزوا مانع تولید هیدروژن کافی برای تولید متان می‌گردد (Hart et al., 2008; Morgavi et al., 2010).

ترکیبات مؤثر موجود در گیاه بابونه کاماسولن (Kamasolen)، آلفا-بیسابولن (α- Bisabolene) و بتا-بیسابولن (β-Bisabolene) می‌باشند (Ebadi et al., 2010). گرچه در مورد استفاده از بابونه گزارشی یافت نشد اما شاید مکانیسم عمل این گیاه در کاهش متان نیز بر اساس تغییر در ساختار سلولی پروتوزوآ یا متانوژن‌ها باشد.

به هر حال، این مورد نیاز به بررسی‌های گسترده‌تری دارد. گیاه دیگری که تولید متان را کاهش داد میخک بود. استفاده از عصاره متانولی و اتانولی این گیاه در پژوهش انجام شده توسط Patra et al. (2010) نیز سبب کاهش ۳۵ و ۸۳ درصدی تولید متان شده است. گیاه مذکور دارای ترکیبات یوگنول (Eugenol) و یوگنول استات (Eugenyl acetate) می‌باشد (Benchaar et al., 2008).

غلظت زیاد یوگنول سبب مهار تولید آمیلاز و پروتئاز در سلول باکتری می‌گردد و همین امر منجر به تجزیه سلولی باکتری می‌شود (Burt, 2004). همچنین، گروه هیدروکسیل یوگنول با پروتئین‌ها باند شده و از عمل آنزیمی سلول باکتری ممانعت به‌عمل می‌آورد (Burt, 2004). مکانیسم‌های ذکرشده در کاهش باکتری‌های تولید کننده متان مؤثر خواهد بود. چای سبز حاوی ساپونین (Mao et al., 2010)، آلفا ترپینن (α-Terpinene)، ۱،۸-سینول (1,8-Cineole)، ترپینن-۴-اُل (Terpinene-4-ol)، گاما-ترپینن (γ-Terpinene) (Benchaar et al., 2088) می‌باشد.

ساپونین چای از طریق مکانسیم تخریب دیواره سلولی سبب کاهش تعداد پروتوزوآ و کاهش میزان هیدروژن تولیدی (سوبستر برای تولید متان) می‌گردد (Mao et al., 2010). به‌علاوه، گزارش شده که تانن

(موجود در رزماری، سماق و بابونه، پلی‌فنول‌های چای سبز) بر کاهش تولید متان مؤثر است.

جدول ۱- حجم کل تولید گاز طی ۲۴ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، درصد گاز متان نسبت به کل گاز و درصد کاهش متان نسبت به خوراک پایه

گیاه	کل گاز تولیدی	درصد متان نسبت به کل گاز	درصد کاهش متان نسبت به خوراک پایه
خوراک پایه	۵۰[b]	۲۶	-
موسیر	۵۶[a]	۱۴	۴۶/۲
خارخسک	۵۶[a]	۲۴	۷/۷
گل گنده	۵۳[a]	۲۵	۳/۸
قولنجان	۵۰[b]	۲۱	۱۹/۲
زنجبیل	۵۱[b]	۲۱	۱۹/۲
هل	۴۸[bc]	۲۰	۲۳/۱
آویشن	۴۸[bc]	۲۰	۲۳/۱
سیاهدانه	۴۶[bc]	۲۰/۴	۲۱/۵
هلیله	۴۶[bc]	۲۱/۴	۱۷/۷
درمنه	۴۶[bc]	۲۴	۷/۷
شیرین‌بیان	۴۵[c]	۲۵	۳/۸
رزماری	۴۴[c]	۱۹	۲۶/۹
ریوند چینی	۴۴[c]	۱۹	۲۶/۹
انیسون	۴۴[c]	۲۳	۱۱/۵
بابونه	۴۳[c]	۱۸/۵	۲۸/۵
میخک	۴۳[c]	۲۰/۴	۲۱/۵
خرفه	۴۳[c]	۲۲/۳	۱۴/۲
زوفا	۴۳[c]	۲۳/۲	۱۰/۷
زنیان	۴۳[c]	۳۰/۵	-۱۴/۸
شاهتره	۴۲[c]	۲۴	۷/۷
سماق	۴۲[c]	۲۵	۳/۸
چای سبز	۴۱[c]	۱۹/۵	۲۵
بومادران	۳۶[c]	۲۵	۳/۸
SEM	۰/۹۹	-	-

علت این امر، کاهش تعداد متانوژن‌ها توسط تانن است که موجب کاهش تولید متان در گوسفند شده است (Wallace et al., 1994; Min et al., 2002).

طی پژوهش حاضر، در تیمار حاوی زنیان افزایش درصد متان نسبت به خوراک پایه مشاهده شد. از آنجایی‌که استفاده از این گیاه سبب افزایش غلظت اسیدهای چرب استیک و بوتیریک شده است (جدول ۲) و از سوی دیگر در واکنش‌های استوکیومتری تولید این دو اسید چرب با تولید دی‌اکسیدکربن و هیدروژن همراه است، لذا سوبسترای مورد نیاز برای واکنش‌های متانوژنسیس (تولید متان) را افزایش داده است (Morgavi et al., 2010). به نظر می‌رسد همین امر منجر به افزایش تولید متان شده است.

تأثیر گیاهان دارویی بر غلظت اسیدهای چرب فرار

همانگونه که در جدول ۲ آمده است، غلظت کل اسیدهای چرب فرار (بر حسب میلی‌مول در لیتر) حاصل از تخمیر نمونه‌های حاوی گیاهان دارویی گل گنده، هلیله، درمنه، رزماری، ریوند چینی، میخک، سماق و بومادران در مقایسه با غلظت کل اسیدهای چرب فرار ناشی از تخمیر خوراک پایه به صورت معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵)؛ اما در تیمارهای زنجبیل، سیاهدانه، بابونه، زنیان و چای سبز نسبت به خوراک پایه بیشتر بود (P<۰/۰۵). نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک یکی از شاخص‌های تخمیر در شکمبه محسوب می‌شود و کاهش نسبت استات به پروپیونات یکی از موارد مثبت اثر ترکیبات موجود در گیاهان دارویی محسوب می‌شود (Mohammed et al., 2004). در پژوهش حاضر، نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک در تیمارهای حاوی موسیر، درمنه، رزماری، ریوند چینی و بابونه در مقایسه با خوراک پایه کاهش یافت (P<۰/۰۵). یکی از مکانیسم‌های شناخته شده که با تأثیر غیر مستقیم موجب تغییر نسبت اسیدهای چرب فرار می‌شود، افزایش مقدار گاز هیدروژن به دلیل مهار شدن مسیرهای تولید متان و باقی ماندن این پیش‌ماده ساخت متان در محیط تخمیر می‌باشد (Van Nevel & Demeyer, 1977).

در این فرایند، افزایش هیدروژن موجب افزایش غلظت پروپیونات می‌شود. از سوی دیگر، مواد مؤثر موجود در گیاهان دارویی به دلیل اثر مستقیم بر آرکایی‌ها (Archaea) موجب تغییر نسبت اسیدهای چرب فرار و افزایش نسبت پروپیونات می‌شود (Van Nevel & Demeyer, 1977).

به هر حال، اثر مواد مؤثر موجود در گیاهان دارویی بر تولید اسیدهای چرب فرار متفاوت بوده است. گزارشات مبنی بر انتخابی بودن عملکرد روغن‌های ضروری بر روی باکتریها و با عملکردهای متفاوت می‌باشد (Molero et al., 2004). تیمول (موجود در زنیان در پژوهش حاضر) پروفایل اسیدهای چرب فرار را نیز در شکمبه تغییر داده است (Newbold et al., 2004).

روغن‌های ضروری به علت خاصیت هیدروفوبی که دارند، وارد ساختار دو لایه غشای پلاسمایی سلول باکتری می‌شوند (Burt, 2004) و موجب تغییر ساختار غشا، افزایش میزان سیالیت و نفوذپذیری غشا و برهم خوردن تعادل یونی دو طرف غشا گردیده و گرادیان یونها کاهش می‌یابد (Newbold et al., 2004). در برخی موارد سلولها توسط پمپ یونی این عدم تعادل را جبران می‌کنند و از مرگ سلول جلوگیری می‌کنند. این عمل موجب صرف مقادیر فراوانی از انرژی می‌شود و سرعت رشد باکتری‌ها را کاهش می‌دهد. این تغییر در سرعت رشد باکتری‌ها موجب تغییراتی در تخمیر و پروفایل اسیدهای چرب می‌شود (Calsamiglia et al., 2007). ساپونین (موجود در رزماری) آثار متفاوتی بر غلظت اسیدهای چرب فرار داشته است. در برخی پژوهش‌ها، پروپیونات را افزایش و استات را کاهش داده است (Hristov et al., 1999; Lila et al., 2003; Liu et al., 2003).

در برخی دیگر از پژوهش‌ها، استفاده از گیاهان حاوی ساپونین موجب افزایش شمار باکتری‌های شکمبه بویژه سلولیتیک‌ها شده است که علت آن را می‌توان به از بین رفتن پروتوزوا و در نتیجه کاهش خورده شدن باکتری‌ها توسط پروتوزوا دانست (Wang et al., 1997, 2000). مصرف آلیسین بر مقدار کل اسید چرب فرار تولید شده در شکمبه تاثیری نداشته است (Busquet et al., 2005). در پژوهش حاضر نیز میزان تولید کل اسیدهای چرب فرار در تیمار حاوی موسیر تفاوتی با

خوراک پایه نداشت، که علت احتمالی آن حضور الیسین در موسیر است.

جدول ۲- غلظت اسیدهای چرب فرار در شیرابه شکمبه و نسبت استات به پروپیونات (میلی‌مول در لیتر)

گیاه	TVFA	اسید استیک	اسید پروپیونیک	اسید بوتیریک	نسبت استات به پروپیونات
خوراک پایه	۵۳[b]	۲۶	۱۲	۹	۲/۲[b]
موسیر	۵۰[bc]	۲۴	۹	۷	۱/۴[c]
خارخسک	۵۸[ab]	۲۸	۱۱	۷	۲/۵[ab]
گل گنده	۴۴[c]	۲۴	۱۲	۵	۲[b]
قولنجان	۵۲[b]	۲۶	۱۳	۹	۲[bc]
زنجبیل	۶۰[a]	۳۱	۱۳	۱۲	۲/۴[a]
هل	۵۷[bc]	۲۷	۱۵	۷	۱/۸[bc]
آویشن	۵۲[b]	۲۴	۱۱	۱۰	۲/۲[b]
سیاهدانه	۶۲[a]	۲۹	۱۵	۱۲	۱/۹[bc]
هلیله	۴۵[c]	۲۲	۸	۱۰	۲/۷[a]
درمنه	۳۹[c]	۱۹	۱۱	۶	۱/۷[c]
شیرین بیان	۵۲[b]	۲۲	۱۲	۱۳	۱/۹[bc]
رزماری	۴۶[c]	۲۱	۱۴	۷	۱/۵[c]
ریوند چینی	۳۲[d]	۱۴	۱۰	۵	۱/۴[c]
انیسون	۴۹[bc]	۲۳	۱۱	۱۱	۲/۱[b]
بابونه	۶۸[a]	۲۹	۱۷	۱۵	۱/۷[c]
میخک	۴۸[c]	۲۵	۱۳	۶	۱/۹[c]
خرفه	۵۳[b]	۲۵	۱۲	۱۰	۲/۱[b]
زوفا	۵۷[ab]	۲۸	۱۲	۱۰	۲/۳[b]
زنیان	۶۳[a]	۳۴	۱۳	۱۲	۲/۶[a]
شاهتره	۵۴[b]	۲۵	۱۲	۱۲	۲/۱[bc]
سماق	۴۱[c]	۲۲	۱۰	۶	۲/۲[b]
چای سبز	۶۵[a]	۳۱	۱۴	۱۲	۲/۲[b]
بومادران	۴۱[c]	۲۳	۹	۶	۲/۵[ab]
SEM	۱/۵۸	–	–	–	۰/۰۹

TVFA: غلظت کل اسیدهای چرب فرار

بسته به شرایط و بر اساس نوع تانن، حضور غلظت‌های متفاوت تانن در جیره آثار متفاوتی بر pH، مقدار آمونیاک و جمعیت میکروبی شکمبه داشته است. در برخی پژوهش‌ها، حضور تانن‌ها موجب کاهش میزان اسید چرب فرار در شکمبه شده است (Dorman & Deans, 2000) (مانند تانن موجود در رزماری و سماق در پژوهش حاضر) در مطالعات دیگر، افزایش گزارش شده است (مانند شرایط احتمالی موجود در تانن موجود در چای سبز و بابونه در پژوهش حاضر) که علت آن را به تأثیر منفی تانن بر جمعیت پروتوزوایی و تجزیه سریع نشاسته و نهایتاً کاهش pH شکمبه مربوط می‌دانند (Min et al., 2005).

جدول ۳- غلظت آمونیاک تولیدی (میلی‌گرم در هر لیتر شیرابه شکمبه)

گیاه	آمونیاک	گیاه	آمونیاک
خوراک پایه	۱۸۵[a]	رزماری	۱۵۳[b]
موسیر	۱۴۵[b]	ریوند چینی	۱۶۵[a]
خارخسک	۱۷۸[ab]	انیسون	۱۳۶[c]
گل گنده	۱۵۸[a]	بابونه	۱۵۴[b]
قولنجان	۱۲۷[c]	میخک	۱۸۲[a]
زنجبیل	۱۶۹[ab]	خرفه	۱۸۹[a]
هل	۱۵۰[b]	زوفا	۱۵۰[b]
آویشن	۱۶۴[ab]	زنیان	۱۷۹[a]
سیاهدانه	۱۸۵[a]	شاهتره	۱۶۰[b]
هلیله	۱۹۲[a]	سماق	۱۶۶[ab]
درمنه	۱۵۷[b]	چای سبز	۱۹۶[a]
شیرین بیان	۱۴۷[b]	بومادران	۱۸۴[a]
SEM	-	-	۱/۰۸

تأثیر گیاهان دارویی بر غلظت آمونیاک شکمبه

بر اساس نتایج جدول ۳، غلظت آمونیاک حاصل از تخمیر نمونه‌های حاوی گیاهان موسیر، گل گنده، قولنجان، هل، درمنه، شیرین بیان، رزماری، انیسون، بابونه، زوفا و شاهتره کوهی در مقایسه با خوراک پایه کاهش یافت ($P<0/05$). در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده که افزودن گیاهان دارویی در شرایط مطلوب موجب کاهش غلظت آمونیاک موجود در شیرابه شکمبه می‌شود (Sliwinski et al., 2002). شرایط مطلوب از این حیث مطرح است که فاکتورهایی مانند ترکیب شیمیایی و دوز مصرف ترکیبات فعال می‌تواند بر متابولیسم نیتروژن در شکمبه اثرگذار باشد. ترکیبات مؤثر متفاوت، آثار متفاوتی بر متابولیسم نیتروژن دارند (Busquet et al., 2006). کاهش غلظت آمونیاک در تیمارهای حاوی برخی از گیاهان دارویی در مقایسه با خوراک پایه ممکن است به دلیل مهار باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین توسط مواد مؤثر موجود در گیاهان دارویی و در نتیجه کاهش تجزیه پروتئین در شکمبه (Sliwinski et al., 2002)، و یا اثر منفی مواد مؤثر موجود در گیاهان دارویی بر باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک با توان بالا باشد که موجب کاهش تولید آمونیاک در شکمبه می‌شود. همچنین، کاهش پروتوزوا و کاهش بلعیده شدن باکتری‌ها توسط آنها نیز می‌تواند از دیگر دلایل کاهش آمونیاک باشد (Busquet et al., 2006). تیمول (موجود

در زنیان در پژوهش حاضر) مقدار نیتروژن آمونیاکی تجزیه شده در شکمبه را کاهش داده داده است (Borchers, 1965; Newbold et al., 2004). کاهش غلظت آمونیاک در تیمار دارای گیاه رزماری احتمالاً به علت حضور ساپونین است، زیرا ساپونین‌ها می‌توانند ترن‌آور پروتئین باکتریایی را کاهش داده و بر غلظت آمونیاک شکمبه اثر گذار باشند (Wallace et al., 1994). اثر تانن بر غلظت آمونیاک بسته به نوع و غلظت تانن متفاوت بوده است (Dorman & Deans, 2000). کاهش غلظت آمونیاک در تیمارهای دارای رزماری، بابونه و درمنه احتمالاً به وجود این ترکیبات تاننی مربوط است. مکمل‌سازی جیره با ترکیبات ترپنی مانند کارواکرول غلظت آمونیاک را کاهش داده است. پیشنهاد شده که کارواکرول یکی از مهمترین ترکیبات مؤثر است و بسیاری از خواص گیاهان دارویی به علت حضور این ترکیب است (Busquet et al., 2006). کاهش غلظت آمونیاک توسط برخی ترپن‌ها توسط دیگران نیز گزارش شده است (Castillejos et al., 2006). ترکیبات ترپنی موجود در درمنه شناسایی شده است.

نتیجه‌گیری کلی

در غربالگری بین گونه‌های مختلف گیاهی با هدف شناسایی گونه‌های کاهنده تولید متان در محیط انکوباسیون، موسیر، هل، آویشن، سیاهدانه، رزماری، ریوند چینی، بابونه، میخک و چای سبز توانایی کاهش قابل ملاحظه گاز متان را داشتند. به هر حال، تنها موسیر بدون آنکه حجم کل گاز تولیدی را کم کند، دارای بیشترین تأثیر مثبت مانند کاهش تولید گاز متان بود و برای کاهش دادن تولید گاز متان در نشخوارکنندگان توصیه می‌شود. به هر حال، تصمیم‌گیری نهایی درباره استفاده از این گیاه برای کاهش تولید متان نیازمند تحقیق با استفاده از دام زنده می‌باشد.

REFERENCES

1. Acamovic, T. & Brooker, J. D. (2005). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(3), 403–412.
2. 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.
3. Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Journal of Nutrition*, 136, 716–725.
4. Azadi, H. Gh., Riazi, Gh. H., Ghaffari, S. M., Ahmadian, Sh. & Javdani, T. (2009). Effects of *Allium hirtifolium* (Iranian shallot) and its allicin on microtubule and cancer cell lines. *African Journal of Biotechnology*, 8(19), 5030-5037
5. Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A. & Beauchemin, K. A. (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. Borchers, R. (1965). Proteolytic activity of rumen fluid *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 24, 1033–1038.
8. Broderick, G. A. & 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.
9. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
10. Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2006). Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89, 761–771.
11. Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Carro, M. D. & Kamel, C. (2005). Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science,* 88, 4393–4404.
12. Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L. & Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2580–2595.
13. Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P. & Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 159–161.

14. Castillejos, L., Calsamiglia, S. & Ferret, A. (2006). Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *Journal of Dairy Science*, 89, 2649–2658.
15. Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Losa, R. (2007). Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oils compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 132, 186–201.
16. Castillejos, L., Calsamiglia, S., Mart´ın-Teresob, J. & Ter Wijlen, H. (2008). *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 259–270.
17. Chizzola, R., Hochsteiner, W. & Hajek, S. (2004). GC analysis of essential oils in the rumen fluid after incubation of Thuja orientalis twigs in the Rusitec system. *Research of Vet. Science*, 76, 77–82.
18. Chwalek, M., Ple, K. & Voutquenne-Nazabadioko, L. (2004). Synthesis and hemolytic activity of some hederagenin diglycosides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 52, 965–971.
19. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582.
20. Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A. & Trombetta, D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 55, 6300–6308.
21. Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.
22. Dudareva, N., Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135, 1893–1902.
23. Ebadi, M., Azizi, M., Omidbaigi, R. & Hassanzadeh khayyat, M. (2010). Effect of sowing date and harvest frequency on flower yield, essential oil percent and composition of chamomile (*Matricaria recutita* L.) CV. Presov. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 26, 213 -226. (In Farsi).
24. Evans, J. D & Martin, S. A. (2000). Effects of Thymol on Ruminal Microorganisms. *Dcurrent Microbiology*, 41, 336–340.
25. Feldberg, R. S., Chang, S. C., Kotik, A. N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D. C. & Thompson, N. H. (1988). *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents Chemistry*, 32, 1763–1768.
26. Garcia-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M., Bodas, R. & Gonzalez, J. S. (2008). Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro. Animal Feed Science and Technology*, 147, 36–52.
27. Garcia-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M. & Gonzalez, J. S. (2005). Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). 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. 444–447.
28. Glauert, A. M., Dingle, J. T. & Lucy, J. A. (1962). Action of saponin on biological membranes. *Nature*. 196, 953–955.
29. Greathead, H. (2003). Plant and plant extract for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 279– 290.
30. Hart, K. J., Yanez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R. & Newbold. C. J. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 8–35.
31. Hart, K. J., Girdwood, S. E., Taylor, S., Yanez-Ruiz, D. R. & Newbold, C. J. (2006). Effect of allicin on fermentation and microbial populations in the rumen simulating fermentor Rusitec. *Reproduction Nutrition Development*, 46 (Suppl. 1), S 97.
32. Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, L., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590–3595.
33. Hristov, A. N., McAllister, T. A., Van Herk, F. H., Cheng, K. J., Newbold, C. J. & Cheeke, P. R. (1999). Effect of Yucca schidigera on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *Journal of Animal Science*, 77, 2554–2563.
34. Iason, G. (2005). The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory: ecological perspectives, In Symposium on 'Plants as animal foods: a case of catch. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64, 123–131.
35. Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603–608.
36. Kalemba, D. & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813–829.

37. Lila, Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T. & Itabashi, H. (2003). Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 86, 3330–3336.
38. Liu, J. Y., Yuan, W. Z., Ye, J. & Wu, Y. (2003). Effect of tea (*Camellia sinensis*) saponin addition on rumen fermentation in vitro. In: Matching herbivore nutrition to ecosystems biodiversity. Tropical and subtropical agrosystems. *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Nutrition of Herbivore*. Merida, Mexico.
39. Macheboeuf, D., Morgavi, D. P., Papon, Y., Mousset, J. L. & Arturo-Schaan, M. (2008). Dose–response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Animal Feed Science and Technology,* 145, 335–350.
40. MacIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A. & Newbold, C. J. (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 5011–5014.
41. Makkar, H. P. S. (2003). Effect and fate of tannin in ruminant animals, adaptation to tannin, strategies to overcome detrimental effect of feeding tannin-rich feed. *Small Ruminant Research*, 49, 241-256.
42. Mao, H. L., Wang, J. K., Zhou, Y. Y., & Liu, J. X. (2010). Effect 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.
43. Menke, K. H. & Steingass, H. (1987). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7–55.
44. Min, B. R, Pinchak, W. E., Fulford, J. D. & Puchala, R. (2005). Effect of feed additives on in vitro and *in vivo* rumen characteristic and frothy bloat dynamics in steers grazing weat pasture. *Animal feed science and Technology*, 123-124, 615-629.
45. Min, B. R., Attwood, G. T., Reilly, K., Sun, W., Peters, J. S., Barry, T. N. & McNabb, W. C. (2002). Lotus corniculatus condensed tannins decrease *in vivo* populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 911–921.
46. Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z. A., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S. & Itabashi, H. (2004). Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. *Journal of Animal Science*, 82, 1839–1846.
47. Molero, R., Ibara, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Losa, R. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Animal feed science and Technology*, 114, 91–104.
48. Morgavi, D. P., Forano E., Martin, C. & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4(7), 1024–1036.
49. Moss, A. R., Jouany, J. & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annual Zootechnology*, 49, 231–253.
50. Newbold, C. J., McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R. & Wallace, R. J. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 114, 105–112.
51. Newbold, C. I., McIntosh, F. M. & Wallace, R. J. (1998). Changes in the microbial population of a rumen simulating fermenter in response to yeast culture. *Canadian Journal of Animal Science*, 78, 241–244.
52. Patra, A. K., Kamra, D. N. & Agarwal, N. (2010). Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds *in vitro*. *Journal Science Food Agriculture*, 90, 511–520.
53. Sliwinski, B. J., SolivaCarla, R., Machmüller, A. & Kreuzer, M. (2002). Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101, 101–114.
54. Statistical Analysis System. (2001). User's Guide: Statistics, Version 8.2, SAS Institute, Cary, NC, USA.
55. Steel, R. G. D. & Torrie, J. H. (1980). *Principles and Procedures of Statistics*: A Biometrical Approach (2nd Ed.). USA: McGraw-Hill. New York.
56. Stewart, C. S. & Duncan, S. H. (1985). The effect of avoparcin on cellulolytic bacteria of the ovine rumen. *Journal of General Microbiology*, 131, 427–435.
57. Teferedegne, B., McIntosh, F., Osuji, P. O., Odenyo A., Wallace, R. J. & Newbold, C. J. (1999). Influence of foliage from different accessions of the sub-tropical leguminous tree, Sesbania sesban, on ruminal protozoa in Ethiopia and Scottish sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 11–20.
58. Ultee, A., Kets, E. P. W. & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Applied Environmental Microbiology,* 65, 4606–4610.

59. Van Nevel, C. J. & Demeyer, D. I. (1977). Effect of monensin on some rumen fermentation parameters. *Annales de Recherches Veterinaries*, 10, 338–340.
60. Wallace, R. J., Arthaud, L. C. & Newbold, J. (1994). Influence of Yucca schidigera extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 762–767.
61. Wang, Y., McAllister, T. A., Yanke, L. J., Xu, Z., Cheeke, P. R. & Cheng, K. J. (2000). *In vitro* effects of steroidal saponins from Yucca schidigera extract on rumen microbial protein synthesis and ruminal fermentation. J. Sci. Food Agric., 80, 2114–2122.
62. Wang, Y., McAllister, T. A., Newbold, C. J., Cheeke, P. R. & Cheng, K. J. (1997). Effects of Yucca extract on fermentation and degradation of saponins in the Rusitec. *Proc. Western Section, Am. Society of Animal Science*, 48, 149–152.
63. Williams, A. G. & Coleman, G. S. (1992). *The Rumen Protozoa*. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
64. Yildiz, S., Kaya, I., Unal, Y., Aksu Elmali, D., Kaya, S., Censiz, M., Kaya, M. & Oncuer, A. (2005). Digestion and body weight change in Tuj lambs receiving oak (*Quercus hartwissiana*) leaves with and without PEG. *Animal Feed Science and Technology*, 122, 159-172.