مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۱ (۲۹۶-۲۸۷)

تاثیر عصاره گل گاو زبان بر تخمیرشکمبه‌ای، جمعیت پروتوزوآیی و کاهش تولید گاز متان به روش برون‌تنی

ابراهیم نوریان سرور[1] و یوسف روزبهان[2*]
۱، ۲، دانشجوی دکتری و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
(تاریخ دریافت : ۹۰/۱۲/۱ – تاریخ تصویب: ۹۱/۴/۳)

چکیده

در این مطالعه تاثیر سطوح متفاوت عصاره گل گاو زبان (۳ ، ۳۰ ، ۳۰۰ و ۳۰۰۰ میکرولیتر) با استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم جیره پایه بر خصوصیات تخمیر شکمبه و تولید گاز متان به روش برون‌تنی بررسی شد. فراسنجه‌های مورد مطالعه عبارتند از: گاز کل تولیدی و متان تولیدی، نیتروژن آمونیاکی، تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی مادهٔ آلی، شاخص راندمان سنتز پروتئین میکروبی (PF) (میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه شده بخش بر میلی‌لیتر گاز تولیدی) و غلظت اسیدهای چرب فرار. جمعیت پروتوزوآیی کل و سه زیر خانواده *Entodiniinae* ، *Ophryscolecinae*، *Diplodiniinae* و یک خانواده *Isotrichdae* و رابطه آن‌ها با گاز متان نیز بررسی گردید. با افزایش مقدار عصاره گیاه دارویی در محیط تخمیر، گاز تولیدی از بخش نامحلول نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۱). افزودن عصارهٔ گل گاو زبان در دو سطح ۳۰۰ و ۳۰۰۰ میکرولیتر سبب افزایش (P<۰/۰۱) گاز تولیدی در زمان‌های۲۴ و ۵۴ ساعت شد. عصاره افزودنی بدون اینکه سبب تغییر در تجزیه‌پذیری مادهٔ آلی شود، گاز متان تولیدی در هر چهار سطح عصاره را کاهش داد (P<۰/۰۵)، به طوریکه بیشترین کاهش متعلق به سطوح ۳ و۳۰ و۳۰۰ میکرولیتر و به ترتیب با ۵۴، ۴۱ و ۴۳ درصد کاهش بود. عصارهٔ گل گاو زبان غلظت نیتروژن آمونیاکی را کاهش داده است (P<۰/۰۱) و از سوی دیگر شاخص PF در تمامی سطوح عصاره کاربردی بهبود یافت (P<۰/۰۱). عصاره گل گاو زبان اسیدهای چرب فرار کل، اسید استیک را کاهش (P<۰/۰۵) و اسید پروپیونیک را افزایش داد(P<۰/۰۵). همچنین، گل گاو زبان دارای فعالیت ضد پروتوزوآیی بوده و سبب کاهش جمعیت پروتوزوآیی کل، زیر خانواده *Diplodiniinae*، *Ophryscolecinae* و خانواده *Isotrichdae* شد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که گل گاو زبان توانایی بهبود تخمیر شکمبه-ای در شرایط برون تنی را دارد.

واژه های کلیدی: عصارهٔ گل گاو زبان، متان، تخمیر شکمبه، گوسفند.

مقدمه

جمعیت ۱/۵۷ میلیاردی نشخوارکنندگان جهان (FAO, 2010) در حدود۱۱۰-۸۰ میلیون متر مکعب گاز متان در هر سال تولید و از طریق آروغ وارد اتمسفر می‌کنند (Johnson & Johnson, 1995) که این مقدار در حدود ۳۳ تا ۳۸ درصد از کل گاز متان تولیدی در جهان را تشکیل می‌دهد (Beauchemin et al., 2008 ; McGinn et al., 2004). بعد از دی اکسیدکربن، گاز متان از مهمترین گازهای گلخانه‌ای در فرایند گرم شدن زمین است (Wright & Klieve, 2011).

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

با توجه به تاثیر گلخانه‌ای گاز متان (۲۳-۲۵ برابر بیشتر از گاز دی اکسیدکربن) (Agarwal et al., 2009 ; Forster et al., 2007;) و طول عمر آن در مقایسه با N_2O (۱۱۴ سال در مقایسه با ۱۲ سال) اهمیت کاهش تولید متان دو چندان می‌گردد (Wright & Klieve, 2011).

هر گوسفند با میانگین وزن ۴۰ کیلوگرم، مقدار ۲۶/۱ لیتر متان به ازاء هر کیلوگرم جیره مصرفی در هر روز تولید می‌کند (McAlister & Newbold, 2008)، از سوی دیگر وجود تقریباً ۵۳/۸ میلیون راس گوسفند در ایران و رتبه چهارم کشور از لحاظ تعداد گوسفندان در جهان (FAO, 2010) بر اهمیت کنترل تولید گازهای گلخانه‌ای در کشور می‌افزاید.

آرکایاهای متانوژنیک (Methanogenic Archaea) تحت شرایط بی‌هوازی در شکمبه، CO_2 را با H_2 ترکیب نموده و محصول متان را تولید می‌کنند. لذا سبب کاهش تراکم گاز هیدروژن تولیدی در طی متابولیسم میکروبی در شکمبه می‌شوند (Pen, 2007). در غیر اینصورت گاز هیدروژن در شکمبه تجمع یافته، سبب توقف اکسیداسیون مجدد NADH، رشد میکروبی، هضم غذا و بدنبال آن توقف تولید اسیدهای چرب فرار می‌گردد (Joblin, 1999). لذا هرگونه راهکار کاهش متان می‌بایست یک مسیر جایگزین را برای حذف H_2 در شکمبه در نظر بگیرد (Eckard et al., 2010).

از سوی دیگر شکل‌گیری فرایند متانوژنزیز (Methanogenesis) بسته به مقدار جیره مصرفی، سبب هدر روی ۲-۱۵ درصدی انرژی خام مواد غذایی مصرفی می‌گردد (Johnson & Johnson, 1995; Agarwal et al., 2009). به همین خاطر مطالعهٔ فرایند تخمیر شکمبه گوسفندان با هدف کاهش متان دارای دو جنبه تغذیه‌ای و زیست محیطی است. از جنبه تغذیه‌ای، تغییرات جیره‌ای از طریق کاربرد گیاهان دارویی می‌تواند سبب کاهش دفع متان در نشخوارکنندگان شود. عصاره‌های گیاهی یکی از گزینه‌های مناسب و بی‌نظیر جهت جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها با هدف بهبود تخمیر شکمبه گوسفندان است (Hart et al., 2008). بسیاری از گیاهان توانایی سنتز متابولیت‌های ثانویه (ساپونین، تانن و اسانس) را دارند که این متابولیت‌ها دارای خاصیت ضد میکروبی، توانایی تعدیل تخمیر شکمبه‌ای و در نهایت بهبود مصرف مواد مغذی هستند (Hristov et al., 2008). اثرهای اصلی آن‌ها در شکمبه، کاهش تجزیه پروتئین و نشاسته، مهار و کاهش تجزیه اسیدهای آمینه در شکمبه است (Benchaar et al., 2008 ; Burt, 2004). همچنین، تکنیک آزمون تولید گاز برون‌تنی روش آزمایشگاهی رایج جهت ارزیابی مواد خوراکی دام (اندازه‌گیری متان، جرم میکروبی و اسیدهای چرب فرار) درنشخوارکنندگان است (Anele et al., 2011). گل گاو زبان با نام علمی *Echium amoenum* از خانواده یا تیره گاوزبان‌ها (Boraginaceae) از گیاهان دارویی است (Omidbeygi, 2010). مطالعات فیتوشیمیایی بر روی این گیاه نشان داده است که دارای ترکیبات شیمیایی مانند فلاوانوئیدها، ساپونین و ترپنوئیدهای غیر اشباع می‌باشد (Shafigi et al., 2002). تاکنون هیچ‌گونه گزارش علمی در خصوص کاربرد این گیاه در تغذیه دام منتشر نشده است. با توجه به اهمیت تغذیه‌ای و زیست محیطی دفع گاز متان در نشخوارکنندگان (Hu et al., 2005) و همچنین، آثار مثبت گیاهان دارویی بر تخمیر شکمبه، هدف از این تحقیق کاربرد و توسعه راهکارهای تغذیه‌ای کاهش متان دفعی و بهبود تخمیر شکمبه‌ای از طریق مهار واکنش‌های متانوژنزیز با استفاده از عصاره گیاه دارویی گل گاو زبان بود.

مواد و روش ها

عصاره گل گاو زبان

عصاره اتانولی این گیاه به روش هوهن‌هایم (Hohenheim) در آزمایشگاه علوم دامی استخراج گردید (Vercoe et al ., 2010b).

دام و مدیریت آن

جهت دریافت مایع شکمبه از سه راس گوسفند نژاد افشاری مجهز به فیستوله شکمبه با میانگین وزن ۲/۹±۴۳/۸ کیلوگرم استفاده شد. گوسفندان با استفاده از جیره پرواری ۶۰ درصد کنسانتره (جو، سویا، سبوس، نمک، جوش‌شیرین و مکمل معدنی ویتامینه) و ۴۰ درصد علوفه (یونجه خشک) و روزانه سه مرتبه (۹ صبح، ۱۴ و ۱۹ عصر) تغذیه شدند. نیاز گوسفندان به انرژی، پروتئین، مواد معدنی و ویتامین بر اساس توصیه

NRC(2007) تنظیم گردید. آب تازه بصورت مداوم در اختیار آن‌ها قرار داشت.

آزمون تولید گاز به روش آزمایشگاهی *(IVGP)*

به همین منظور مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا یونجه و کنسانتره (جو) با نسبت ۴۰ به ۶۰ استفاده گردید. عصاره مایع گل گاو زبان در پنج سطح صفر (شاهد)، ۳، ۳۰، ۳۰۰ و ۳۰۰۰ (میکرولیتر) و هر سطح در سه تکرار به محیط تخمیر اضافه شد. بطری‌های ویتن (Wheaton Bottle) ۱۱۷ میلی‌لیتری و محتویات داخل آن (۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا و ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری شده) در دمای ۳۹ درجه سلسیوس انکوباسیون شدند. محلول بافر مطابق روش Menke & Steingass (1988) تهیه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون مقدار گاز تولیدی کل در هر بطری توسط سرنگ مدرج و گاز متان (گاز گروماتوگرافی) قرائت گردید.

در یک آزمایش جداگانه به منظور برآورد کینتیک تخمیر، آزمون تولید گاز با استفاده از سرنگ‌های مدرج شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری و به مدت ۵۴ ساعت انکوباسیون، انجام گرفت. آزمایش در سه نوبت با ۳ تکرار در هر نوبت، انجام شد.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های تخمیر

بعد از پایان انکوباسیون، مقدار گاز تولیدی بطری-های ویتن با استفاده از سرنگ‌های مدرج اندازه‌گیری شد و بر اساس گاز تولیدی بلانک تصحیح گردید. مقادیر گاز متان تولیدی در هر بطری با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (دستگاه شیماتزو ژاپن) با ستون فشرده (Supelco, St. Louis, MO, USA) و آشکار ساز یونی شعله‌ای (Flame Ionization Detector) و با استفاده از استاندارد خارجی گاز متان (استاندارد با غلظت ۵۰،۴۰، ۱۰۰ ، ۲۰۰ ، ۳۰۰ ، ۴۰۰ ، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر متان خالص)، محاسبه شد. مقادیر هر یک از اسیدهای چرب فرار استات، پروپیونات و بوتیرات با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (شیماتزو ژاپن) و با ستون مویرگی(Capillary Column) و با استفاده از استاندارد داخلی (۲-اتیل بوتیریک اسید) تعیین شد. شاخص نسبت استات به پروپیونات نیز محاسبه شد Cottyn & (Boucque, 1968; Patra et al., 2006).

غلظت ازت آمونیاکی بوسیله روش فنول-هیپوکلریت و با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین گردید Broderick & Kang, (1980).

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

برای تعیین شاخص PF (معرف مقدار سنتز پروتئین میکروبی) از روش Makkar (2010) استفاده شد. شاخص PF عبارت است از میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه شده بخش بر میلی‌لیتر گاز تولیدی که مطابق با رابطه۱محاسبه گردید (Vercoe et al., 2010a).

$$PF = c - (a-b)/ IVGP \qquad (\text{رابطه ۱})$$

که در معادله مذکور c مادهٔ آلی وزن شده در هر بطری (میلی‌گرم) ، a مقدار مواد تجزیه نشده در هر بطری (*a* mg) ، b مقدار خاکستر مواد تجزیه نشده در هر بطری (*b* mg) و IVGP گاز تولیدی است. مادهٔ آلی تجزیه شده نیز بر اساس رابطه ۲ محاسبه شد (Vercoe et al., 2010a).

$$OMDe\ (mg) = c - (a - b) \qquad (\text{رابطه۲})$$

بعد از اندازه‌گیری حجم گاز تولیدی در طی ۲۴ ساعت انکوباسیون، محتویات داخل بطری ویتن را به داخل یک بشر انتقال داده و توسط محلول شوینده خنثی (Neutral Detergent Solution=NDS) و حرارت به مدت ۱ ساعت در دستگاه مجهز به مبرد شسته شد. سپس محتویات داخل محلول شوینده را توسط کاغذ صافی بدون خاکستر تصفیه نموده و باقی مانده توسط آون و در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس و به مدت ۱۰ ساعت خشک گردید. آنگاه با کسر وزن بوته خالی از بوته با محتویات بعد از آون، مقدار مواد تجزیه نشده در هر بطری (*a* mg) محاسبه شد. سپس بوته و محتویات داخل آن به کوره انتقال داده شد و در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس مقدار خاکستر آن (*b* mg) محاسبه گردید. با تفریق مقدار *b* از *a* ، ماده آلی تجزیه نشده برحسب میلی‌گرم محاسبه می‌شود (Vercoe et al., 2010a).

مقادیر توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز توده میکروبی نیز با استفاده از رابطه ۳ و به روش Makkar (2010) محاسبه شد (Vercoe et al., 2010a).

رابطه (۳) $MM(mg)= [c-(a-b)]-[NGml\times2.2]$

که در این رابطه :

MM= میلی گرم توده میکروبی تولید شده

NG= میلی لیتر گاز خالص تولیدی

2.2= ضریب استوکیومتری

شمارش جمعیت پروتوزوآ

شمارش میکروسکوپی پروتوزوآ به روش Dehority (2004) انجام گرفت. جمعیت پروتوزوآی مژکدار شکمبه بر اساس سه زیر خانواده *Entodiniinae*، *Ophryscolecinae*، *Diplodiniinae* و خانواده *Isotrichdae* شمارش گردید و سپس رابطه بین متان تولیدی و جمعیت پروتوزوآیی با تعیین رابطه رگرسیونی بین دو متغیر مورد بررسی قرار گرفت. در این روش با استفاده از لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰x جمعیت پروتوزوآیی در ۶ تکرار شمارش شد.

تجزیه وتحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمون تولید گاز (گاز تولیدی، متان، اسیدهای چرب فرار، نسبت اسیداستیک به اسید پروپیونیک، غلظت ازت آمونیاکی،PF و تجزیه پذیری ماده آلی) و جمعیت زیر خانواده پروتوزوآ و ارتباط بین آن با تولید متان در طول دوره انکوباسیون با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS۱۸ (2009) برای ۵ تیمار (شاهد، سطوح۳، ۳۰،۳۰۰،۳۰۰۰ میکرولیتر عصاره) و در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه گردید. داده‌ها بر اساس مدل آماری $Y_{ijk}=\mu+T_{i+}\ \varepsilon_{ijk}$ تجزیه شدند که در آن، Y_{ij}مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار و ε_{ijk}مقدار باقیمانده بود. برای مقایسه میانگین هر تیمار با تیمار شاهد از روش آزمون دانت و مقایسه دو به دو تیمارها با یکدیگر از آزمون دانکن در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ استفاده شد.

نتایج و بحث

آزمون تولیدگاز، متان تولیدی و پارامترهای تخمیرشکمبه در شرایط برون تنی

تولید متان از طریق تخمیر دستگاه گوارش نشخوارکنندگان نه تنها سبب هدرروی انرژی جیره شده بلکه دارای تاثیرات سوء زیست محیطی نیز می‌باشد. بنابراین، کاهش متان دارای فواید اقتصادی و محیطی است (Hu et al., 2005). نتایج تاثیر کاربرد عصاره اتانولی گل گاو زبان بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای و گاز متان تولیدی در جدول ۱ نشان داده شده است. افزایش مقدار عصاره گل گاو زبان سبب افزایش خطی معنی‌دار گاز تولیدی از بخش دیر تخمیر (P<۰/۰۵) شد. سطوح ۳ و۳۰ میکرولیتر عصاره سرعت تخمیر را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد (P<۰/۰۵) اما تفاوت معنی‌داری در سرعت تخمیر در سطوح بالای عصاره مشاهده نشد. نتایج مشابهی در تحقیق قبلی (Kongmun et al., 2010) با کاربرد سطوح مختلف روغن نارگیل و پودر سیر به روش برون‌تنی گزارش شده است.

گاز کل تولیدی در طی تخمیر ۵۴ ساعته در سطح۳۰۰ و۳۰۰۰ میکرولیتر عصاره، افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد داشت (P<۰/۰۵). تغییرات معنی‌دار گاز تولیدی ۷۲ ساعته در مطالعه Kongmun et al. (2010) به روش برون تنی در اثر مصرف سطوح مختلف روغن نارگیل و پودر سیر نیز مشاهده شده است. در مطالعهٔ عصاره سه نوع گیاه (*A. A.concinna, E. officinalis* و *T. belerica*) به روش برون تنی، Patra et al. (2006) دلیل افزایش گاز کل در طی دوره تخمیر را افزایش قند محلول در محیط به دلیل حضور عصاره گیاه دانسته‌اند. به نظر می‌رسد در این تحقیق وجود موسیلاژ (کربوهیدرات) در گل گاو زبان (Omidbeygi, 2010) سبب افزایش گاز کل در طی دوره تخمیر۵۴ و ۲۴ ساعته شده است.

میزان متان تولیدی (میکرو مول به ازاء هر کیلوگرم مادهٔ آلی تجزیه شده) در هر چهار سطح عصارهٔ کاربردی در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). مقدار گاز متان تولیدی در چهار سطح ۳، ۳۰،۳۰۰ و ۳۰۰۰ میکرولیتر عصاره کاربردی در مقایسه با شاهد به ترتیب ۵۴/۲، ۴۱/۳، ۴۳/۲ و۳۱/۷ درصد کاهش نشان داد (جدول۱). کاهش گاز متان در اثر کاربرد روغن نارگیل و پودر سیر (Kongmun et al.,

2010)، کاربرد عصاره متانولی گیاه *T. chebula* (Patra et al., 2006)، کاربرد عصاره گیاه *Yucca schidigera* (۲،۴ و ۶ میلی‌لیتر) (Pen et al.,2006) و کاربرد ساپونین چای (Hu et al .,2005) نیز مشاهده شده است.

در مطالعه Patra et al. (2006) با استفاده از عصاره متانولی، اتانولی و آبی پنج نوع گیاه (*Acacia concinna* (Shikakai), *Terminalia chebula* (harad), *Terminalia belerica* (bahera), *Emblica officinalis* (amla)) , *Azadirachta indica* (neem seed) تنها عصاره متانولی *T.chebula* توانسته است میزان متان تولیدی را ۹۵٪ کاهش دهد. این محققین تانن موجود در این گیاه را دلیل احتمالی کاهش متان ذکر کرده‌اند. این چنین ارتباط مشابه خطی بین تولید گاز کل و متانوژنزیز نیز در مطالعات Agrawal et al. (2006) در کاربرد عصاره گیاه Sapindus mukorossi و Agrawal et al. (2009) نیز مشاهده شده است.

مطالعات نشان داده است در حدود ۹-۲۵ درصد ارتباط همزیستی بین آرکایاهای متانوژن و پروتوزوآ مژکدار وجود دارد (Newbold et al., 1995) و پروتوزوآ مژکدار شکمبه‌ای، H_2 مورد نیاز را بعنوان سوبسترا جهت سنتز گاز متان برای متانوژن‌ها فراهم می‌کنند (Morgavi et al., 2010).

لذا به نظر می‌رسد آثار کاهشی عصاره گل گاو زبان در تولید متان، به خاطر وجود ساپونین و ترکیبات فلاوانوئیدی (Shafigi et al., 2002) و اثرات مهارکنندگی ساپونین بر پروتوزوآ مژکدار Hu et al., (2005) و بر باکتری‌های متانوژنیک (Hess et al., 2003) و یا کاهش باکتری‌های سلولایتیک (Wang et al., 2000) بوده همچنانکه سبب افزایش تولید پروپیونات و کاهش نسبت استات به پروپیونات نیز شده است (جدول۱).

غلظت ازت آمونیاکی (میلی‌گرم/ لیتر) در چهار تیمار کاربردی در مقایسه با تیمار شاهد کاهش نشان داده است($P<۰/۰۱$). کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای با عصاره همراه با افزایش میزان پروتئین میکروبی تولید شده نشان می‌دهد که نیتروژن احتمالاً به سمت تولید پروتئین میکروبی استفاده شده است.

همچنین، ساپونین موجود در گل گاو زبان احتمالاً باعث کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز و در نهایت سبب کاهش نیتروژن آمونیاکی شده است (Hussain & Cheeke, 1995). نتایج مشابهی نیز مبنی بر کم شدن نیتروژن آمونیاکی در حضور گیاه حاوی ساپونین (*Yucca schidigera*) (Pen et al., 2006) و عصاره گیاه حاوی ساپونین Quillaja *saponaria* (Pen, 2007) و تاثیر کاهشی ساپونین چای بر نیتروژن آمونیاکی و افزایش پروتئین میکروبی (Mao et al., 2010) گزارش شده است.

مقدار مادهٔ آلی تجزیه شده برون‌تنی در بین تیمارها تغییر معنی‌داری نداشت. به نظر می رسد ترکیبات موثره گل گاو زبان توانایی تغییر جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم‌های موثر بر قابلیت هضم ماده آلی را ندارد.

بر خلاف نتایج این تحقیق، Patra et al. (2006) تاثیر مهار کنندگی عصاره‌های گیاهی *T.chebula, E.officinalis* و *A.indica* بر قابلیت گوارش ماده آلی را ناشی از اثر ترکیبات موثره این گیاهان بر فعالیت باکتریایی و آنزیمی دانسته‌اند. وجود عصارهٔ گل گاو زبان در محیط سبب افزایش شاخص PF یا مادهٔ آلی تجزیه شده به ازاء گاز تولیدی شد ($P<۰/۰۵$). همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است افزایش شاخص PF در دو سطح پایین عصاره، در مقایسه با دو سطح بالاتر عصاره بیشتر بوده است ($P<۰/۰۵$). شاخص PF در این مطالعه در دامنه عددی قابل قبول ۴/۶۵-۲/۷۴ بود (Blümmel et al., 1997). مقایسه نتایج و بررسی رابطهٔ گاز متان با شاخص PF مشخص می‌کند که با کاهش گاز متان و کاهش نیتروژن آمونیاکی، شاخص PF بیشتر شده است؛ به نحوی که تیماری که بیشترین کاهش گاز متان را داشته است (۳ میکرولیتر عصاره) بیشترین مقدار PF را دارد.

نتایج مشابهی نیز توسط Garc´ıa- et al. Gonz´alez (2008) ، Goel et al. (2008) و Blümmel et al. (2005) مشاهده شده است. لذا مطابق با نظر Blümmel et al., (1997) افزایش شاخص PF در این بررسی نشان دهنده بهبود راندمان تخمیر است. افزودن

عصاره گل گـاو زبـان، اسـیدهای چـرب فـرار کـل را در مقایسه با تیمار شاهد به صورت غیر خطـی کـاهش داده اسـت (P<۰/۰۱). از آنجاییکـه کـاهش واکـنش‌هـای متانوژنزیز (در سطوح آزمایشی عصاره) احتمالاً منجر به تجمع گاز هیدروژن در محیط تخمیر می‌شود، بنـابراین، تجمع گاز هیدروژن سـبب توقـف اکـسیداسیون مجـدد NADH و بدنبال آن باعث کـم شـدن تولیـد اسـیدهای چرب فرار شده است (Joblin, 1999).

جدول۱- اثر افزودن عصارۀ گل گاو زبان بر گاز تولیدی و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه

	سطح عصارۀ در محیط تخمیر (میکرو لیتر)						سطح معنی‌داری	
	شاهد	۳	۳۰	۳۰۰	۳۰۰۰	SEM	L	Q
مقادیر شاخص فعل و انفعالات تخمیر								
b	۵۹/۳۰^{c}	۵۸/۸۰^{c}	۶۱/۵۰^{c}	۷۵/۴۰^{b}	۹۲/۴۰^{a}	۲/۵۵	**	**
c	۰/۰۶۷^{b}	۰/۰۸^{a}	۰/۰۷۵^{ab}	۰/۰۶۷^{b}	۰/۰۶۱^{b}	۰/۰۸	ns	**
گاز تولیدی (۵۴ ساعت)	۶۷/۰۰^{c}	۶۷/۵۰^{c}	۶۹/۷۰^{c}	۸۲/۵۰^{b}	۸۹/۹۰^{a}	۱/۹۳	**	**
گاز کل تولیدی (۲۴ ساعت) (۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک/میلی‌لیتر)	۵۶/۲۰۰^{b}	۵۷/۸۰^{b}	۵۹/۳۰^{b}	۶۸/۶۰^{a}	۷۱/۱۰^{a}	۱/۴۶	**	ns
گاز متان (۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک/میکرو مول)	۵۴۱/۰۰^{a}	۲۴۷/۶۰^{d}	۳۱۷/۵۰^{bc}	۳۰۷/۰۰^{c}	۳۶۹/۷۰^{b}	۲۰/۱۹	*	**
گاز متان (میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده/میکرو مول)	۴۸۵/۱۰^{a}	۲۱۸/۸۰^{b}	۲۳۹/۸۰^{b}	۲۷۵/۳۰^{b}	۳۲۶/۷۰^{a}	۴۶/۶۴	*	**
ازت آمونیاکی (لیتر/میلی‌گرم)	۲۰/۰۰^{a}	۱۷/۴۰^{b}	۱۳/۴۰^{d}	۱۵/۷۰^{c}	۱۴/۴۰^{c}	۰/۷۵	**	**
تجزیه پذیری آزمایشگاهی ماده آلی IVOMDe	۱۷۸/۱۲	۱۷۸/۲۴	۱۷۸/۲۴	۱۷۸/۲۴	۱۷۸/۲۲	۲/۲۳	ns	ns
(میلی‌لیتر گاز تولیدی/میلی‌گرم PF ماده آلی تجزیه شده)	۲/۸۰^{c}	۳/۵۰^{a}	۳/۳۰^{ab}	۳/۲۰^{b}	۳/۱۰^{b}	۱/۳۶	ns	**
توده میکروبی (میلی‌گرم)	۳۳/۶۰^{d}	۶۸/۹۰^{a}	۵۶/۸۰^{b}	۵۴/۳۰^{b}	۴۵/۴۰^{c}	۲/۱۲	ns	**
راندمان سنتز توده میکروبی (درصد)	۱۹/۰۰^{d}	۳۹/۰۰^{a}	۳۲/۲۰^{b}	۳۰/۵۰^{b}	۲۵/۴۰^{c}	۱/۱۳	ns	**
اسیدهای چرب فرار کل (۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک/میلی مول)	۵۴/۰۰^{a}	۴۴/۰۰^{b}	۴۳/۶۰^{b}	۵۳/۶۰^{a}	۴۶/۶۰^{b}	۴/۰۰	ns	*
اسیدهای چرب فرار (۱۰۰ مول/مول)								
اسید استیک (C2)	۵۷/۶۰^{a}	۴۲/۳۰^{b}	۴۵/۰۰^{b}	۴۶/۹۰^{b}	۵۵/۱۰^{a}	۲/۰۷	ns	**
اسید پروپیونیک (C3)	۲۳/۳۰^{c}	۳۸/۹۰^{a}	۳۰/۵۰^{b}	۳۲/۰۰^{b}	۲۶/۱۰^{c}	۱/۴۰	ns	**
اسید بوتیریک (C4)	۱۹/۳۰	۱۸/۷۰	۲۴/۳۰	۲۱/۰۰	۲۰/۵۰	۲/۲۸	ns	ns
نسبت استیک به پروپیونیک (C2:C3)	۲/۶۰^{a}	۱/۲۰^{d}	۱/۷۰^{c}	۱/۵۰^{cd}	۲/۱۰^{b}	۰/۱۷	**	**

حروف غیر مشابه در هر سطر نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (p<۰/۰۵ ، p<۰/۰۱). SEM: خطای معیار میانگین‌ها. *b*: پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک) ، *c*، نرخ تخمیر بخش b (/h).

لذا در این تحقیق ترکیبات موثره عصاره گل گاو زبان (ساپونین، فلاوانوئیدها) سبب جهت‌گیـری واکنـش های محیط به سمت افزایش پروتئین میکروبی و کاهش اسیدهای چرب فرار کل شده است. کاهش

اسیدهای چرب فرار در مطالعه Garc´ıa-Gonz´alez et al. (2008) بعلت استفاده از دو گیاه *Rheum officinale* و *Frangula alnus* و مطالعه Patra et al. (2006) در اثر کاربرد عصاره دو گیاه *T.chebula* و *A.indica* نیز گزارش شده است.

نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که در مقایسه با تیمار شاهد، مقدار اسید استیک کاهش و اسید پروپیونیک افزایش یافته است (P<۰/۰۱). با توجه به رابطه تولید متان با دو اسید چرب فوق الذکر، مشخص می‌شود که هر چه واکنش‌های متانوژنزیز کمتر گردد تولید اسید استیک کمتر و اسید پروپیونیک بیشتر می‌شود (Garc´ıa-Gonz´alez et al., 2008). از سوی دیگر استات عمده محصول پایانی متابولیسم مواد در پروتوزوآ است (Hess et al., 2003) و لذا کاهش جمعیت پروتوزوآ (جدول ۲) در هر چهار تیمار آزمایشی احتمالاً سبب کاهش اسید استیک می‌گردد (Patra et al., 2006). همراه بودن کاهش متان و جمعیت پروتوزوآ با کمتر شدن غلظت اسید استیک در مطالعه Hess et al . (2003) و Patra et al. (2006) مشاهده شده است. بروز چنین نتایجی سبب شده است که نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک (C_2/C_3) کاهش مطلوبی (P<۰/۰۱) را در سه سطح ۳، ۳۰ و ۳۰۰ میکرولیتر عصاره (سه تیماری که بیشترین کاهش متان را داشته‌اند)، نشان دهد. عصاره گل گاو زبان تاثیری بر غلظت اسید بوتیریک در هر چهار تیمار آزمایشی نداشته است.

شمارش پروتوزوآ

نتایج در جدول ۲ نشان می‌دهد که جمعیت پروتوزوآیی کل در اثر عصاره گل گاو زبان در هر چهار تیمار آزمایشی کاهش داشته است (P<۰/۰۵) که احتمالاً بدلیل وجود ترکیب ساپونین در این گیاه است (Goel et al., 2008). این ترکیب دارای توانایی ایجاد پیوند با استرول غشاء سلولی پروتوزوآ بوده و سبب تغییر نفوذ پذیری سلول شده و در نهایت منجر به تجزیه سلولی پروتوزوآ می‌شود (Newbold et al., 1995; Patra et al., 2006). نتایج مشابهی نیز توسط Pen, (2007) و Goel et al., (2008) نیز گزارش شده است. در یک مقاله مروری توسط Morgavi et al., (2010) گزارش شده است که جمعیت کل پروتوزوآ بر تولید متان اهمیت کمتری دارد و به منظور تعیین موثرترین پروتوزوآی مژکدار در تولید متان، بهتر است آن‌ها را به تفکیک مورد بررسی قرار داد. بنابراین، اثر گیاه گل گاو زبان بر جمعیت چهار زیر خانواده و یک خانواده پروتوزوآ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان می دهد که عصاره گیاه دارویی تنها تاثیری بر جمعیت زیرخانواده انتودینینه نداشت و سایر زیر خانواده‌های مورد مطالعه (افریواسکلوسینه، دیپلو دینینه و خانواده ایزوتریچیدا) را کاهش داد (P<۰/۰۵). در مطالعه گیاه *Yucca schidigera* که حاوی ساپونین است؛ Wang et al. (2000) بیان داشته‌اند که ساپونین استرادیل تاثیر مهارکنندگی بر پروتوزوآ مژکدار داشته و از این طریق سبب کاهش گاز متان می‌گردند. در بررسی حاضر نیز کاهش جمعیت پروتوزوآ، کاهش متان، کاهش اسید استیک و افزایش اسید پروپیونیک موید اثر ضد پروتوزوآیی ترکیبات موثرۀ گل گاو زبان (ترکیبات فلاوانوئید و ساپونین) می‌باشد. گزارشات متعددی در خصوص تاثیر کاهشی ساپونین گیاهان متنوع بر جمعیت پروتوزوآیی و بدنبال آن کاهش متان وجود دارد (Patra et al., 2006; Pen, 2007; Goel et al., 2008).

از آنجاییکه پروتوزوآ از طریق تولید گاز هیدروژن بعنوان سوبسترا برای واکنش متانوژنزیز(Hu et al., 2005) و محافظت آرکایا باکتریا از سمیت در برابر اکسیژن، در تولید متان سهیم هستند (Morgavi et al., 2010)، لذا به نظر می‌آید مطالعۀ رابطۀ تولید متان و زیرخانواده‌های پروتوزوآ ضروری است. مطالعه بررسی رابطه بین پروتوزوآ و متان تولیدی نشان داد که در حدود ۱۴ تا ۳۶ درصد بین جمعیت پروتوزوآ و باکتری-های تولیدکننده متان همزیستی وجود دارد. نتایج مشابهی هم در این خصوص توسط Newbold et al. (1995)گزارش شده است. با توجه به حذف جمعیت خانواده ایزوتریچیدا در سه سطح۳۰، ۳۰۰ و۳۰۰۰ میکرولیتر عصاره و کاهش سه برابری جمعیت این خانواده در تیمار ۳ میکرولیتر عصاره و حذف جمعیت افریواسکلوسینه در دو سطح۳۰۰ و ۳۰۰۰ میکرولیتر در مقایسه با تیمار شاهد، به نظر می‌رسد که خانواده

ایزوتریچیدا، زیر خانواده اُفریواسکلوسینه و دیپلودینینه به ترتیب بیشترین رابطه را با کاهش متان دارند. لذا همین موضوع موید تاثیر ضد پروتوزوآیی عصاره گل گاوزبان می‌باشد.

جدول۲- : اثر عصارهٔ گل گاوزبان بر جمعیت پروتوزوآ ($۱۰^{۵}$×/ میلی لیتر) در آزمون تولید گاز و ارتباط بین زیر خانواده پروتوزوآ (x) با متان تولیدی(y).

پروتوزوآ	سطوح عصاره افزودنی (میکرو لیتر)					
	شاهد	۳	۳۰	۳۰۰	۳۰۰۰	سطح معنی-داری
	جمعیت پروتوزوآ مژکدار ($۱۰^{۵}$×/ میلی لیتر)					
پروتوزوآ کل زیرخانواده	۲/۴۴^{a}	۱/۹۳^{b}	۱/۶۷^{b}	۱/۸۳^{b}	۱/۵۶^{b}	*
انتودینینه	۱/۲۷	۱/۶۱	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۸۳	ns
افریواسکلوسینه	۰/۵^{a}	۰/۳۳^{b}	۰/۲۲^{b}	۰/۰۰	۰/۰۰	*
دیپلو دینینه	۰/۸۳^{a}	۰/۳۸^{b}	۰/۲۲^{b}	۰/۲۷^{b}	۰/۱۱^{c}	*
ایزوتریچیدا (خانواده)	۰/۵۵^{a}	۰/۱۷^{b}	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	*

ارتباط بین پروتوزوآ (x) با متان تولیدی(y).

انتودینینه	y=۴۸۳/۲+۰/۰۴X (r = ۰/۲۸) R^2=۰/۰۸۲	y=۲۲۴/۴-۰/۰۰۰X R^2=۰/۰۳۳(r = ۰/۱۸)	y=۳۸۹/۴-۰/۰۰۱X R^2=۰/۹۲ (r = ۰/۳۰)	y=۲۴۴/۱-۰/۰۰۰۵X R^2=۰/۰۵ (r = ۰/۰۷)	y=۳۱۸/۲+۰/۰۰۵X R^2=۰/۰۵ (r = ۰/۰۷)
افریواسکلوسینه	-	_	y=۱۴۴/۵+۰/۰۰۱X R^2=۰/۷۷(r =۰/۲۸۴)	-	-
دیپلودینینه	y=۴۶۴/۱+۰/۰۰۰X (r = ۰/۳۷) R^2=۰/۱۳۵	y=۲۴۲/۳+۰/۰۰۰X R^2=۰/۰۶ (r = ۰/۴۵)	y=۱۵۴/۹+۰/۰۰۳X R^2=۰/۹۴ (r = ۰/۴۴)	y=۲۴۰/۰++۰/۰۰۰۵X R^2=۰/۰۱ (r = ۰/۰۳)	y=۳۲۰/۷+۰/۰۰۰X R^2=۰/۴۲ (r = ۰/۲۰)
ایزوتریچیدا (خانواده)	y=۴۵۴/۰+۰/۰۰۰X (r =۰/۲۸۴) R^2=۰/۰۸۱	-	-	-	-
پروتوزوآ کل	-۰/۰۰۰۰۵X y=۴۸۸/۶ (r = ۰/۲۲) R^2=۰/۰۵۰	y=۱۷۲/۲+۰/۰۰۰۸X R^2=۰/۴۵ (r = ۰/۳۸)	y=۳۶۰/۱-۰/۰۰۱X R^2=۰/۸۳ (r = ۰/۴۳)	y=۲۸۳/۹-۰/۰۰۰۸X R^2=۰/۴۱ (r = ۰/۲۰)	y=۳۰۹/۲+۰/۰۰۰۵X R^2=۰/۳۴ (r = ۰/۳۶)

R^2 = ضریب تبیین ؛ r = ضریب همبستگی ؛ حروف لاتین متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در شرایط برون‌تنی، عصاره گل گاوزبان باعث کاهش گاز متان تولیدی همراه با بهبود شاخص PF گردید، و همزیستی بین پروتوزوآ و تولید متان به میزان ۲۵ درصد وجود دارد. به هر حال با توجه به اینکه شرایط این آزمایش برون تنی بوده است لذا بهتر است برای حصول

اطمینـــان، عصـــاره ایـــن گیـــاه بـــر روی دام زنـــده نیـــز بـــررســـی گـــردد.

REFERENCES

1. Agarwal, N., Kamra, D.N., Chaudhary, L.C. & Patra, A.K. (2006). Effect of *Sapindus mukorossi* extracts on *in vitro* methanogenesis and fermentation characteristics in buffalo rumen liquor. Journal Applied Animal Research, 30, 1–4.
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. Anele, U.Y., Südekuma, K. H., Hummel, J., Arigbedeb, O.M., Onic, A.O., Olaniteb, J.A., B̥ttgera, C., Ojob, V.O. & Jolaoshob, A.O. (2011). Chemical characterization, *in vitro* dry matter and ruminal crude protein degradability and microbial protein synthesis of some cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp) haulm varieties. *Animal Feed Science and Technology*, 163,161–169.
4. Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F. & McAllister, T.A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review.*Australian Journal Experimental Agriculture*, 48, 21–27.
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. Blümmel, M., Makkar, H.P.S. & Becker, K.(1997). *In vitro* gas production: a technique revisited, *Journal Animal Physiology and Nutrition*, 77, 24–34.
7. 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.
8. 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.
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. 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.
11. Dehority, B.A. (2004). *In vitro* determination of generation times for *Entodinium exiguum*, *Ophryoscolex purkynjei* and *Eudiplodinium maggii*. *Journal Eukaryote Microbial*, 51, 333–338.
12. 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.
13. Food and Agriculture Organization. (2010). Statistic. Statistical year book. Statistical year book 2010. Http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/en
14. Forster,P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D.W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz,M. & Van Dorland, R. (2007). Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M.,Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds.), Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press,Cambridge, UK.
15. Garc´ıa-Gonz´alez, R., S. L´opez,M. Fern´. & Gonz´alez, J.S. (2008). 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. 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.
17. Hart, K.J., Y´a˜nez-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.
18. 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.
19. Hristov, A.N., Ropp, J.K. Zaman, S. & Melgar, A. (2008). Effects of essential oils on *in vitro* ruminal fermentation and ammonia release. *Animal Feed Science and Technology*, 144, 55–64.

20. 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.
21. 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.
22. Joblin, K.N. (1999). Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian. Journal Agriculture Research*, 50, 1307–1313.
23. Johnson, K.A. & Johnson, D.E. (1995). Methane emission from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483-2492.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. McAllister, T.A. & Newbold, C.J. (2008). Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48 (1-2), 7-13.
28. McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T . & Colombatto, D. (2004). Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Animal Science*, 82, 3346–3356.
29. Menke, K.H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* 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. Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Riccardo Losa. & Wallace. R.J. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 114, 105–112.
34. Omid Beygi, M.R. (2010). Medical Plant (First ed) I.R of Iran: Behnashr Press. (In Farsi).
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Shafaghi,B., Naderi,N., Tahmasb,L. & Kamalinejad, M. (2002). Anxiolytic Effect of *Echium amoenum* L. in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 1, 37-41.
39. SPSS. (2009). SPSS Version 18.0 for Windows. SPSS Inc., USA.
40. Vercoe,E.P., Makkar,H.P.S. & Schlink ,A.C. (2010a). *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.
41. Vercoe, E.P., Makkar, H.P.S. & Schlink , A.C. (2010b). *In Vitro* Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies (Ed.), *Screening Plants for the Antimicrobial Control of Lactic Acidosis in Ruminant Livestock* (pp. 159-189). New York: Springer.
42. 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.
43. Wright, A.G. & Klieve, A.V. (2011). Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? . *Animal Feed Science and Technology*, 166-167, 248-253.